

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



AISLAMIENTO BIODIRIGIDO DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD
ANTIVIRAL CONTRA VHS-1 y VHS-2 A PARTIR DE PLANTAS DEL
NORESTE DE MÉXICO

Por
M.C. DAVID ARTURO SILVA MARES

Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTORADO EN CIENCIAS con
Especialidad en Química Biomédica

SEPTIEMBRE, 2012

**AISLAMIENTO BIODIRIGIDO DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD
ANTIVIRAL CONTRA VHS-1 y VHS-2 A PARTIR DE PLANTAS DEL
NORESTE DE MÉXICO**

Aprobación de Tesis:

DRA. VERÓNICA MAYELA RIVAS GALINDO
Directora de Tesis

DR. ERNESTO TORRES LÓPEZ
Co-Director de Tesis

DRA. NOEMÍ WAKSMAN DE TORRES
Co-Directora de Tesis

DRA. ANA MARÍA GUADALUPE RIVAS ESTILLA
Comisión de Tesis

DRA. PAULA CORDERO PÉREZ
Comisión de Tesis

DR. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

**AISLAMIENTO BIODIRIGIDO DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD
ANTIVIRAL CONTRA VHS-1 y VHS-2 A PARTIR DE PLANTAS DEL
NORESTE DE MÉXICO**

Presentado por:

M.C. DAVID ARTURO SILVA MARES

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Química Analítica, Departamento de Inmunología y Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo y la Co-dirección del Dr. Ernesto Torres López.

DIRECTORA

Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo

Co-Director

Co-Directora

Dr. Ernesto Torres López

Dra. Noemí Waksman de Torres

RESUMEN

M.C. David Arturo Silva Mares

Fecha de graduación: Septiembre, 2012

Universidad Autónoma de Nuevo León
Faculta de Medicina

Título de estudio: AISLAMIENTO BIODIRIGIDO DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIVIRAL CONTRA VHS-1 y VHS-2 A PARTIR DE PLANTAS DEL NORESTE DE MÉXICO

Número de páginas: 125

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias
con especialidad en Química Biomédica

Área de estudio: Química Analítica

Propósito y Método del Estudio: La infección con virus del herpes simplex (VHS-1 y VHS-2) es una enfermedad ampliamente distribuida en todo el mundo, tiene una gran prevalencia en países en vía de desarrollo como en el caso de México. Actualmente solo existe para su tratamiento medicamentos análogos de la guanina como el aciclovir y famciclovir, sin embargo; estos agentes antivirales no erradican el virus del huésped, además se ha registrado la aparición de nuevas cepas de VHS resistentes a estos fármacos en pacientes inmunocomprometidos. Debido a lo anterior es importante continuar la búsqueda de nuevos agentes anti-herpéticos. En México, es muy amplio el conocimiento y manejo de plantas medicinales. Para el presente estudio, se seleccionaron 3 plantas regionales en base a criterios quimiotaxonómicos y etnofarmacológicos para llevar a cabo la búsqueda de compuestos antivirales. Como primera etapa, se evaluó la actividad citotóxica de *J. dioica*, *S. texana* y *S. ballotaeflora* por el método de MTT, a continuación, en función de su menor citotoxicidad se seleccionó a *J. dioica* para determinar su actividad anti-herpética contra VHS-1 y VHS-2 mediante el ensayo de reducción de placas. Una vez demostrada la actividad antiherpética de la planta, se llevó a cabo el aislamiento biodirigido de compuestos con actividad antiherpética mediante el uso de diversos métodos cromatográficos y ensayos de evaluación antiviral.

Contribuciones y Conclusiones: De las tres plantas seleccionadas, solo *J. dioica* fue seleccionada para llevar a cabo el aislamiento biodirigido de al menos un compuesto con actividad antiherpética. Mediante el aislamiento biodirigido se aisló un diterpeno conocido como riolozatriona a partir de *J. dioica*. La riolozatriona presentó actividad antiherpética con un índice de selectividad de 5.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS

Dra. Verónica Mayela Rivas Galindo

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1 Introducción	1
1.1 Herpes virus	1
1.2 Plantas Medicinales.	13
1.3 Plantas de Estudio.	17
1.4 Evaluación de Actividad Citotóxica y Antiviral.	20
1.5 Justificación	22
1.6 Objetivo General	22
1.7 Objetivos Específicos	23
2 MATERIAL Y MÉTODOS	24
2.1 Material, Equipo y Reactivos.	24
2.1.1 Material.	24
2.1.1.1 Material de Laboratorio.	24
2.1.1.2 Material Biológico.	26
2.1.2 Equipo.	27
2.1.3 Reactivos.	29
2.1.3.1 Disolventes.	29
2.1.3.2 Reactivos Especiales.	30
2.2 Métodos.	31
2.2.1 Colecta de Plantas.	31
2.2.2 Obtención de Extractos Hidroalcohólicos.	31
2.2.3 Cultivo de Células.	32
2.2.4 Preparación de Extractos, Fracciones y/o Compuesto para la Determinación de la Actividad Biológica.	32
2.2.5 Evaluación de la Actividad Citotóxica (TC ₅₀).	33
2.2.6 Determinación del Título Viral del Concentrado viral de VHS-1 y VHS-2.	34
2.2.7 Evaluación de la Actividad Antiherpética.	36
2.2.7.1 Determinación del IC ₅₀ .	36

2.2.7.1.1 Determinación del IC ₅₀ de Extractos Hidroalcohólicos, Diferenciales y Compuesto Aislado CSG4-F2.	36
2.2.7.1.2 Determinación del IC ₅₀ del ACV.	36
2.2.7.2 Determinación del porcentaje de reducción de placas a la concentración de 250 µg/mL.	37
2.2.8 Determinación del Índice de Selectividad.	37
2.2.9 Fraccionamiento Biodirigido de Extracto Hidroalcohólico de <i>J. dioica</i> .	37
2.2.9.1 Extracción Diferencial de <i>J. dioica</i> .	37
2.2.9.2 Fraccionamiento Biodirigido del Residuo Acuoso.	38
2.2.9.2.1 Condiciones de Elución para Columna Cromatográfica CLFR29.	38
2.2.9.2.2 Inyección de Residuo Acuoso en Columna Cromatográfica CLFR29.	38
2.2.9.2.3 Sistemas de Elución de Capa Fina para Residuo Acuoso.	39
2.2.9.2.4 Condiciones de Elución para CLAR.	39
2.2.9.3 Fraccionamiento Biodirigido del Extracto Hexánico.	40
2.2.9.3.1 Condiciones de Elución para Columna Cromatográfica CSG4.	40
2.2.9.3.2 Inyección de extracto diferencial Hexánico en Columna Cromatográfica CLFR29.	40
2.2.9.3.3 Sistemas de Elución de Capa Fina para Extracto Diferencial Hexánico.	40
2.2.10 Análisis de Pureza Cromatográfica del Compuesto Aislado.	41
2.2.11 Elucidación estructural del Compuesto Activo Aislado.	42
2.2.11.1 Espectroscopía de Masas.	42
2.2.11.2 Espectroscopía Ultra Violeta–Visible (UV-Vis).	42
2.2.11.3 Espectroscopía de Infrarrojo (IR).	43
2.2.11.4 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).	43
2.2.11.5 Actividad Óptica.	43
3 RESULTADOS	44
3.1 Colecta de Plantas.	44
3.2 Obtención de Extractos Hidroalcohólicos.	45
3.3 Evaluación de la Actividad Citotóxica (TC ₅₀) de Extractos Hidroalcohólicos de <i>J. dioica</i> <i>S. texana</i> y <i>S. ballotaeflora</i> .	46
3.4 Determinación del Título Viral de VHS-1 y VHS-2.	47
3.5 Evaluación de la Actividad Antiherpética (IC ₅₀) de Extracto Hidroalcohólico de <i>J. dioica</i> .	49
3.6 Determinación del Índice de Selectividad del Extracto Hidroalcohólico de <i>J. dioica</i> .	50
3.7 Fraccionamiento Biodirigido de Extracto Hidroalcohólico de <i>J. dioica</i> .	51
3.7.1 Obtención de extractos diferenciales del extracto hidroalcohólico de <i>J. dioica</i> , evaluación de citotoxicidad y de	

actividad antiherpética y determinación de IS.	51
3.7.2 Fraccionamiento Biodirigido del Residuo Acuoso.	54
3.7.3 Fraccionamiento Biodirigido del Extracto Hexánico.	57
3.8 Análisis de Pureza.	60
3.9 Análisis Espectroscópico	61
3.9.1 Espectroscopía de Masas.	61
3.9.2 Espectroscopía UV-Vis.	62
3.9.3 Espectroscopía de IR.	62
3.9.4 Espectroscopía de RMN.	62
3.10 Actividad Óptica.	63
3.11 Evaluación de Actividad Citotóxica (TC ₅₀) del Compuesto Aislado CSG-F2.	63
3.12 Evaluación de Actividad Antiherpética (IC ₅₀) del Compuesto Aislado CSG-F2.	64
3.13 Determinación del Índice de Selectividad del Compuesto Aislado CSG-F2.	65
4 DISCUSIÓN	66
5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	81
5.1 Conclusiones	81
5.2 Perspectivas	83
BIBLIOGRAFÍA	84
APÉNDICE	100

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1 Estimación Global de la Prevalencia de Infección de VHS-2 en 2003	8
2 Sistema de Eluentes Utilizado para CLFR29.	38
3 Porcentaje de los Solventes Utilizados en el Gradiente de Elución.	39
4 Condiciones para Cromatógrafo de Gases Acoplado a Masas.	41
5 Datos de la Recolección y Autentificación de las Plantas.	45
6 Porcentajes de Recuperación de Extractos Hidroalcohólicos de <i>J. dioica</i> , <i>S. texana</i> y <i>S. ballotaeflora</i> .	45
7 Valores de TC ₅₀ para los Extractos Hidroalcohólicos de <i>J. dioica</i> <i>S. texana</i> y <i>S. ballotaeflora</i> .	46
8 UFP contadas de cada tubo utilizado en el ensayo de reducción de placas.	49
9 Determinación de la IC ₅₀ del Extracto Hidroalcohólico de <i>J. dioica</i> .	49
10 Determinación del Índice de Selectividad del Extracto Hidroalcohólico de <i>J. dioica</i> .	51
11 Extractos, Pesos y Porcentajes de Recuperación Obtenidos de la Extracción Diferencial de Extracto Hidroalcohólico de <i>J. dioica</i> .	51
12 Determinación de TC ₅₀ de Extractos Diferenciales de <i>J. dioica</i> .	52
13 Determinación de la Actividad Antiherpética de Extractos Diferenciales de <i>J. dioica</i> .	53
14 Determinación del Índice de Selectividad de Extractos Diferenciales de <i>J. dioica</i> .	54
15 Porcentajes de Recuperación de Fracciones Obtenidas de la Columna	

CLFR29.	55
16 Determinación de Actividad Antiherpética de Fracciones Obtenidas de la Columna CLFR29.	57
17 Porcentajes de Recuperación de Fracciones Obtenidas de la Columna CSG4.	58
18 Determinación de Actividad Antiherpética de Fracciones de Columna CSG4.	60
19 Determinación de la Actividad Citotóxica del Compuesto Aislado CSG4-F2.	64
20 Determinación de la Actividad Antiherpética del Compuesto Aislado CSG4-F2.	64
21 Determinación del Índice de Selectividad del Compuesto Aislado CSG4-F2.	65

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Estructura de la Desoxi-riboguanosina y del ACV.	9
2 Mecanismo de Acción del ACV.	10
3 Diagrama de Flujo para el Aislamiento de Compuestos con Actividad Biológica.	16
4 a) Gráfica de Tubos Utilizados para las Diluciones Logarítmicas del Stock Viral. b) Fotografía de Placas de Seis Pozos Correspondientes a los Tubos de Dilución Condiciones para Cromatógrafo de Gases Acoplado a Masas.	35
5 Curvas Dosis Respuesta de Extractos Hidroalcohólicos de <i>J. dioica</i> <i>S. texana</i> y <i>S. ballotaeflora</i> .	47
6 Ensayo de Reducción de Placas del Extracto Hidroalcohólico de <i>J. dioica</i> Contra VHS-1.	50
7 Curvas Dosis Respuesta de Extractos de Hexano, Acetato de Etilo, Butanol y Residuo Acuoso de <i>J. dioica</i> .	52
8 Cromatografía de Capa Fina de Residuo Acuoso y Fracciones de Columna CLFR29.	55
9 Cromatogramas de CLAR de Residuo Acuoso y Fracciones de Columna CLFR29.	56
10 Cromatografía de Capa Fina de Extracto de Hexano y Fracciones de Columna CSG4.	58
11 Cromatogramas de CLAR de Extracto de Hexano y Fracciones de Columna CSG4.	59
12 a) Cromatograma CLAR de Fracción CSG4-F2. b) Espectros de UV-Visible de Tres Puntos de Pico de CSG4-F2. c) Cromatograma de Gases de CSG4-F2.	61

13	Estructura Propuesta para el Compuesto Aislado CSG4-F2.	76
14	Estructura de compuesto aislado CSG4-F2 (Rioloatriona).	77
15...	Espectro de Masas del Compuesto Aislado CSG4-F2.	101
16	Espectro UV-Visible del Compuesto Aislado CSG4-F2	102
17	Espectro IR del Compuesto Aislado CSG4-F2.	103
18	Espectro ¹ H-RMN del Compuesto Aislado CSG4-F2.	104
19	Ampliación de la Zona de Multipletes del Espectro ¹ H-RMN del Compuesto Aislado CSG4-F2.	105
20	Ampliación de Espectro ¹ H-RMN del Compuesto Aislado CSG4-F2.	106
21	Espectro 2D COSY del Compuesto Aislado CSG4-F2.	107
22	Espectro ¹³ C-RMN del Compuesto Aislado CSG4-F2.	108
23	Ampliación de Zona de Aromáticos y Carbonilos de Espectro ¹³ C-RMN del Compuesto Aislado CSG4-F2.	109
24	Ampliación de Zona de Alifáticos de Espectro ¹³ C-RMN del Compuesto Aislado CSG4-F2.	110
25	Espectro ¹³ C-RMN, DEPT90 y DEPT 135 del Compuesto Aislado CSG4-F2..	111
26	Espectro del Experimento de 2D de HMQC del Compuesto Aislado CSG4-F2.	112
27	Ampliación del Espectro de 2D de HMQC del Compuesto Aislado CSG4-F2.	113
28	Ampliación del Espectro de 2D de HMQC del Compuesto Aislado CSG4-F2.	114
29	Espectro de 2D de HMBC del Compuesto Aislado CSG4-F2.	115
30	Ampliación de Espectro de 2D de HMBC del Compuesto Aislado CSG4-F2.	116
31	Ampliación de Espectro de 2D de HMBC del Compuesto Aislado CSG4-F2.	117
32	Ampliación de Espectro de 2D de HMBC del Compuesto Aislado CSG4-F2.	118
33	Ampliación de Espectro de 2D de HMBC del Compuesto Aislado CSG4-	

	F2.	119
34	Ampliación de Espectro de 2D de HMBC del Compuesto Aislado CSG4-F2.	120
35	Espectro NOESY del Compuesto Aislado CSG4-F2.	121

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ACV	Aciclovir
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AL-CCF	Cromatografía en capa fina de aluminio
CC	Control de crecimiento celular
CF	Columna Flash
CMV	Citomegalovirus
CLAR FR C-18	Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Fase Reversa de Octadecilsilano
cm	Centímetros
cm⁻¹	Centímetros a la menos uno
Cols	Colaboradores
COSY	Correlation Spectroscopy
C(+)	Control positivo
C(-)	Control negativo
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
d. i.	Diámetro interno
DMEM	Medio Eagles modificación de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EUA	Estados Unidos de América
FBS	Suero bovino fetal

FD	Factor de dilución
g	Gramos
h	Horas
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
H.P.	Horsepower
Hz	Hertz
IC₅₀	Inhibitory Concentration 50
IgG	Inmunoglobulina
IR	Infrarrojo
L	Litro
M.C.	Maestro en Ciencias
MDR	Multidrogoresistente
mg	Miligramos
MHZ	Mega Hertz
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetros
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NAD⁺/NADPH	Nicotinamida adenín dinucleótido/ Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NEAA	Aminoácidos no esenciales
NCCLS	The National Committee for Clinical Laboratory Standards
N.L.	Nuevo León
nm	Nanómetros
nOe	Nuclear Overhauser Effect

OMS	Organización Mundial de la Salud
PAHO	Pan American Health Organization
PBS	Buffer Fosfato Salino
PCR	Polymerase chain reaction
PCV	Penciclovir
ppm	Partes por millón
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
R_f	Cociente de frentes
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RP-18	Reverse Phase de Octadecilsilano
rpm	Revoluciones por Minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
Si-60	Sílica gel 60
TC₅₀	Toxic concentration 50
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UFP	Unidad formadora de placas
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
VEB	Virus de epstein-barr
VHS	Virus hepes simplex
VHH	Virus del herpes humano
VIH/SIDA	Virus de la inmunodeficiencia humana/Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
VVZ	Virus varicela-zóster
WHO	World Health Organization
µg	Microgramos
µL	Microlitro
µm	Micrómetros

%	Por ciento
%V/V	Por ciento Volumen/Volumen
2D	Doble dimensión
¹³CRMN	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
¹HRMN	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
°C	Grados Celsius

El individuo ha luchado siempre para no ser absorbido por la tribu. Si lo intentas, a menudo estarás solo, y a veces asustado. Pero ningún precio es demasiado alto por el privilegio de ser uno mismo.

Friedrich Nietzsche

DEDICATORIA

Este trabajo esta dedicado a la familia Silva Mares con mucho amor y respeto.

Francisco Gerónimo Silva González.

Ma. Guadalupe Mares de los Reyes.

Alejandro Silva Mares.

Juan Francisco Silva Mares.

Ma. Teresa de Jesús Silva Mares.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora y amiga la Dra. Verónica Rivas, por su gran paciencia, conocimientos, confianza y apoyo que me ofreció para llegar a cumplir mi objetivo. Muchas gracias por tenderme la mano, se le tiene en gran estima y verdaderamente fue un placer haber trabajado con usted.

A mi co-asesor y amigo el Dr. Ernesto Torres, por dejarme entrar a su laboratorio y equipo de trabajo, también gracias por sus buenos consejos no solo en lo profesional y por su apoyo en todo momento, principalmente durante el aprendizaje del bioensayo de actividad antiviral.

A mi co-asesora la Dra. Noemí Waksman por toda su gran ayuda, confianza y conocimiento.

Dra. Ana Rivas gracias por abrirme las puertas de su laboratorio y enseñarme todo lo que respecta a cultivo celular, usted me ayudo a enriquecer mucho mi formación profesional.

Dra. Paula Cordero muchas gracias por la confianza y por su apoyo en la parte experimental de citotoxicidad.

A mi amiga la Tec. Ivonne Carrera que de nuevo me aguantó en el laboratorio de extracción, sin su ayuda durante toda la parte experimental.

A las secretarias Martha, Vero, Laura, Selene, Tania y Gloria por facilitarme material, tanto didáctico como de laboratorio.

A mis maestros y compañeros en general de la familia de química analítica que me ayudaron en mi formación académica Dra. Ma. De la Luz, Dra. Rocio Castro, Dr. Ricardo Salazar, Dra. Norma Cavazos, Dra. Aurora Garza, Dra. Rocio Álvarez, Dra. Rosalba Ramírez, Dr. Luis Alejandro Pérez, Dra. Lidia Naccha, M.C. Idalia Carmona, Dra. Tannya Ibarra, M.C. Blanca Alicia, M.C. Anabel Torres, M.C. Lucia Cenicerros, M.C. Elsa Ramirez, Maestra Cristina Treviño, Tec. Karina Álvarez, Graciela Peña, Tec. Agustín Nambo y Marivel Esparza, gracias a todos ustedes por que en algún momento de mi formación me tendieron la mano.

Por supuesto agradecer a la becaria Aidé Moreno que en algún momento me apoyó con la realización de la parte práctica en el laboratorio.

Gracias a todos mis compañeros de posgrado Lorena Lugo, Marsela Tapia, Omar Portillo, Andrés Vargas, Martha Cavazos, Joel López y Tania Coral, por su agradable compañía.

Quiero agradecer de todo corazón también a mis amigos y compañeros de cubículo Grace, Magdis, Perikita, Alice, Brend, Lili y mi gran amigo Jhon, sé que han de pensar que algunos ya no están ahí, pero se equivocan, AHÍ ESTÁN.

Gracias a mis amigos no químicos el Hassanas, Ismahell, Marilia, Ludwing, Nancy, Ayan, Paco, Bárbara Sergio, los Chio y Abuelo.

Gracias a mi esposa Gissela Borrego por estar ahí en todo momento, gracias por el apoyo, por el amor, la motivación, la esperanza y sobre todo por la paciencia.

Por último pero no menos importante quiero agradecer al CONACYT por la beca otorgada No. 164941.

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Herpes Virus.

El herpes simplex es una enfermedad infecciosa de alta frecuencia a nivel mundial (1 y 2). El virus de herpes simplex (VHS) pertenece a la familia del herpes virus (Herpesviridae) misma que incluye un número relativamente grande de virus de tipo ADN; sin embargo, solo algunos afectan y tienen como reservorio al hombre los

cuales se denominan con las siglas VHH (Virus del Herpes Humano) seguido de un número arábigo (3):

VHH-1. Es el virus del herpes simplex tipo 1 (VHS-1) causante de la estomatitis herpética, conocido como herpes labial, *grano de fiebre o grano de calentura*, que ocasionalmente provoca infecciones genitales.

VHH-2. Es el virus del herpes simplex tipo 2 (VHS-2) o herpes genital que produce vesículas y úlceras genitales.

VHH-3. Es el virus de la varicela-zóster (VVZ) causante de la varicela, una enfermedad altamente contagiosa en niños y adultos inmunosuprimidos.

VHH-4. Es el Virus de Epstein-Barr (VEB) causante de la mononucleosis infecciosa, el linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo.

VHH-5. Es el citomegalovirus (CMV) de clínica muy variada observándose lesiones vesiculosas, purpúricas, nódulos, placas verrugosas etc., con más frecuencia en neonatos e inmunodeprimidos. (1).

VHH-6. Es el virus de la roséola infantum, exantema súbito de la infancia.

VHH-7. Parecido al VHH-6 pues provoca los mismos síntomas.

VHH-8. Virus del sarcoma de Kaposi, es un *Rhadinovirus*. (3, 4)

Es importante señalar que solo VHH-1 y VHH-2, conocidos comúnmente como VHS-1 y VHS-2, son los agentes etiológicos causantes del Herpes simplex; éstos difieren serológicamente, sin embargo, desde el punto de vista genético tienen entre un 70 a 75 % de similitud. Ambos virus son de un tamaño aproximado de 150-250 nm y se componen por cuatro elementos estructurales (5):

- Envoltura externa. Formada por porciones de membranas de la célula huésped, que se separan cuando las partículas virales atraviesan el núcleo para pasar al citoplasma y por ultimo abandonar la célula.
- Tegumento. Es un ensamblaje aparentemente amorfo de las proteínas codificadas del virus; algunas ayudan a iniciar el ciclo replicativo en el interior de las células susceptibles, mientras que otras unen la envoltura a la Nucleocápsida
- Nucleocápsida y núcleo. Es un núcleo interno formado por proteínas, tiene un diámetro aproximado de 100 nm y está formado por 162 capsómeros que forman una estructura icosapentaédrica. Cada nucleocápsida contiene un núcleo denso de nucleoproteínas enlazadas alrededor del ADN del virión.
- Genoma viral. Molécula lineal de doble cadena (5)

Ambos tipos de virus pueden ser transmitidos a través de la saliva o de las secreciones lo que generalmente requiere un contacto interpersonal próximo. Tras la infección primaria o pro infección, el virus permanece en su estado latente en los ganglios sensitivos de nervios como el trigémino, el vago o el sacro. A lo largo de toda

la vida pueden ocurrir reactivaciones o recurrencias, que no son más que las manifestaciones clínicas de una nueva fase de replicación vírica y la progresión del virus por las fibras neurales hasta alcanzar la piel. (1, 6). El Herpes simplex es una enfermedad infecciosa altamente frecuente que se caracteriza por la aparición de grupos de vesículas sobre una base eritematosa tanto en mucosa como en la piel, acompañadas por lo general de fiebre, adenopatías, malestar y dolor en las regiones afectadas (2 y 6).

Las infecciones por VHS-1 y VHS-2 ocasionan una variada y oscilante gama de manifestaciones clínicas, que van desde infecciones inaparentes hasta formas graves de evolución fatal. Las formas sintomáticas pueden dar lugar a distintos cuadros como (1):

Infecciones por VHS-1

Gingivostomatitis herpética. Es la forma más frecuente de infección primaria sintomática por VHS-1 en donde se inicia con fiebre alta, malestar general, irritabilidad, dolor bucal intenso salivación excesiva, encías edematosas y enrojecidas. En la lengua, la mucosa yugal, labial, paladar y faringe aparecen con múltiples lesiones vesiculosas con tendencia rápida a erosionarse, dando como resultado la formación de úlceras recubiertas, por una pseudo-membrana amarillenta. Todo esto acompañado de adenopatías dolorosas en región submaxilar y cervical (1, 4).

Encefalitis Herpética. El virus del herpes simplex es la causa más frecuente de encefalitis esporádica (fundamentalmente VHS-1, excepto en el periodo neonatal). El virus puede diseminarse al cerebro durante la infección primaria o en las recurrencias. Las principales manifestaciones son cefaleas, fiebre, dificultad en el habla, trastornos de la conducta y convulsiones focales. Además esta estrechamente relacionado en la enfermedad de Alzheimer (7 y 8).

Herpes Simplex Primario en la Piel. La exposición directa del virus del herpes simplex, a través de soluciones de continuidad en la piel, es capaz de desencadenar la infección primaria, originando el herpes simplex primario de la piel. Se manifiesta en forma de vesículas y ampollas que asientan sobre una base eritematosa y tienden a formar agregados. Con frecuencia se acompaña de adenopatías regionales y las lesiones suelen ser más inflamatorias y agudas, persisten más tiempo y se asocian a más síntomas generales que las infecciones recurrentes (1 y 7).

Queratoconjuntivitis Herpética. La infección primaria por virus del herpes simplex puede aparecer en la córnea y la conjuntiva, dando lugar a una queratoconjuntivitis purulenta que ocasiona dolor intenso y visión borrosa, junto a edema palpebral y unas ulceraciones corneales de morfología dendrítica muy característica. Es habitual que se acompañe de una adenopatía pre-auricular dolorosa. Las recurrencias suelen aparecer

como queratitis, blefaritis o queratoconjuntivitis. La queratitis herpética puede conducir a la ceguera (1 y 7).

Infecciones por VHS-2

Herpes Simplex Primario Genital. Es la infección primaria por VHS-2; se trasmite posterior a infectarse con portadores del VHS-2, tras el inicio de la actividad sexual, aparecen pequeñas vesículas agrupadas que rápidamente se ulceran. En el varón es frecuente se localicen en el glande, el prepucio o el cuerpo del pene. En la mujer puede desarrollarse en los genitales externos, la mucosa vulvar, vaginal o cérvix. Es habitual el dolor, la disuria y las adenopatías regionales. Ocasionalmente los pacientes con un herpes simplex primario genital desarrollan en un 10% de los casos una meningitis aséptica con fiebre, cefalea, fotofobia, rigidez de nuca y pleocitosis en el líquido cefalorraquídeo. Por otra parte, la exposición previa a la infección por VHS-1 no protege frente al contagio del VHS-2. Algunos estudios sugieren que el VHS-2 actúa como co-factor en el desarrollo de cáncer cervical y facilita la infección con el virus del VIH/SIDA (1, 3, 4 y 7).

Además de estos cuadros infecciosos, cabe mencionar otros datos importantes; más del 90% de la población mundial, ha sido infectada por VHS-1 (9), la recurrencia de VHS-1 está asociada a la parálisis facial de Bell (10), así mismo, la causa más frecuente de encefalitis herpética es el VHS-1, en donde las secuelas en los pacientes tratados son significativas y la mortalidad sin tratamiento oscila entre el 60–80 %. La mayor parte de los casos en adultos se presenta en personas mayores de 35 años de

edad (7 y 8). En cuanto a VHS-2 se reportó en el 2010 que cerca de 536 millones de personas alrededor del mundo entre las edades de 15 a 49 años están infectados con VHS-2. Esto significa que cerca del 16% de población mundial se encuentra infectada, de los cuales el 58.7% son mujeres y el 41.3% son hombres. Esta tendencia hacia las mujeres no ha sido aún esclarecida. También se reporta el aumento de la prevalencia conforme aumenta la edad, hasta llegar a una meseta entre los 35 y 39 años (Tabla 1) (11). Por otra parte, la organización mundial de la salud (OMS), publicó en el 2001 que contraer VHS-2 puede aumentar los riesgos de adquirir el virus del VIH/SIDA, como previamente se había mencionado, esto es debido a que las vesículas herpéticas aumentan el riesgo de contraer dicha infección. Por lo anterior también sugieren que el VHS-2 puede ser el responsable de una sustancial cantidad de nuevos casos de infecciones de VIH/SIDA en el continente Africano. En ese mismo año la OMS reportó que la incidencia de VHS-2 es de un 22 % en la población adulta en EUA y un 15 % en la unión europea, destacando con esto el grado de importancia de VHS-2 a nivel mundial (12 y 13). En México la secretaría de salud indicó que hay 7 casos de herpes genital por cada 100,000 habitantes, mientras que en las trabajadoras sexuales hay una prevalencia de 65.1 % de VHS-2 (14).

En la actualidad solo existen tratamientos sistémicos que controlan parcialmente los síntomas y signos de las erupciones herpéticas. El tratamiento más común para las diferentes formas de infecciones causadas por el virus de herpes simplex, es mediante el empleo de los fármacos Aciclovir (ACV) y Penciclovir (PCV) (4 y 6). El ACV es el

primer nucleósido purínico sintético, con una actividad inhibitoria *in vitro* e *in vivo* de los virus de herpes humanos incluyendo el VHS -1 y VHS-2, seguido por el VZV, VEB y en menor medida por el CMV (15 y 16).

Tabla 1. Estimación global de la prevalencia de infección de VHS-2 en 2003 (11).

Edad en años	Prevalencia global en Millones (porcentaje de la población)		
	Mujer	Hombre	Ambos
15–19	25.8 (9.0)	14.6 (4.8)	40.4 (6.9)
20–24	39.4 (15.1)	24.1 (8.8)	63.5 (11.9)
25–29	46.5 (19.0)	30.5 (12.0)	77.1 (15.4)
30–34	51.5 (21.4)	36.1 (14.6)	87.6 (18.0)
35–39	52.9 (23.8)	38.8 (17.1)	91.8 (20.3)
40–44	50.8 (25.9)	38.8 (19.4)	89.6 (22.6)
45–49	47.9 (27.7)	37.8 (21.5)	85.6 (24.6)
Total	314.8 (19.4)	220.7 (13.1)	535.5 (16.2)

El ACV es un potente inhibidor de la replicación del Herpes virus, sin embargo, no se ha determinado la relación cuantitativa entre la susceptibilidad del ACV *in vitro* y la respuesta clínica en el hombre. Los resultados de las pruebas de sensibilidad, expresados como concentración del fármaco requerida, para inhibir en un 50% el crecimiento de los virus en un cultivo celular (IC_{50}), varían dependiendo del ensayo realizado. Por lo general la IC_{50} del ACV frente a VHS-1, oscila entre 0.02 a 13.5

$\mu\text{g/mL}$ en el ensayo de reducción de la placa en células huésped Vero. Mediante el método de captación de colorante en células Vero, método que arroja valores unas 10 veces más altos que los obtenidos en los ensayos de reducción de placa, el valor de IC_{50} para VHS-2 es según reportes de aproximadamente $0.45 \mu\text{g/mL}$, para VZV la $\text{IC}_{50} = 0.9 \mu\text{g/mL}$, para EBV el valor de IC_{50} va de 4 a $11.25 \mu\text{g/mL}$. El CMV tiene una menor sensibilidad ya que su IC_{50} es de $225.2 \mu\text{g/mL}$ (17,18 y 19). El ACV es usado por vía intravenosa, oral y tópica, en el tratamiento de infecciones causadas por los virus antes mencionados tanto en adultos como en niños (20 y 21).

La estructura química del ACV está estrechamente relacionada con la estructura química del ADN, parecida a una desoxiguanosina con la diferencia que ésta carece de los carbonos 2' y 3' además del grupo 3'-hidroxi de la desoxirribosa (Figura 1), observándose como consecuencia un apertura del ciclo. La ausencia de átomos de carbono en las posiciones 2' y 3' provoca que este análogo de guanosina, sea incapaz de participar efectivamente en la síntesis de ADN.

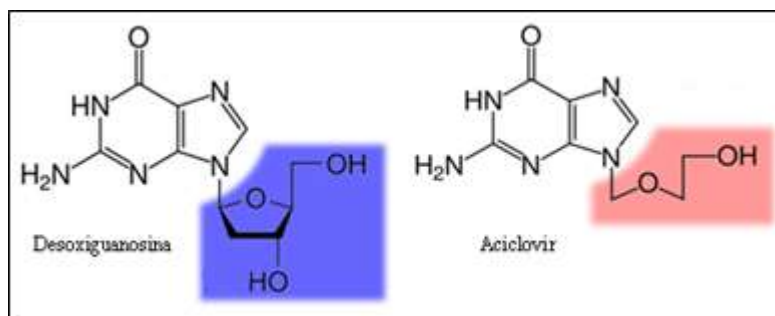


Figura 1. Estructura de la Desoxiguanosina y ACV.

La acción inhibitoria del ACV es selectiva para los VHS-1, VHS-2, VZV y EBV (Figura 2), debido a que la forma inactiva de ACV es fosforilada selectivamente por una timidina-quinasa codificada por el virus, antes que por una quinasa del huésped como primer paso de activación (la enzima timidina-quinasa de las células no infectadas no es sustrato para el ACV). El ACV monofosfato es posteriormente convertido en ACV difosfato por una guanilato quinasa. Transformaciones posteriores dependientes de enzimas de la célula huésped los convierten en la forma activa trifosfato de ACV (Figura 2).

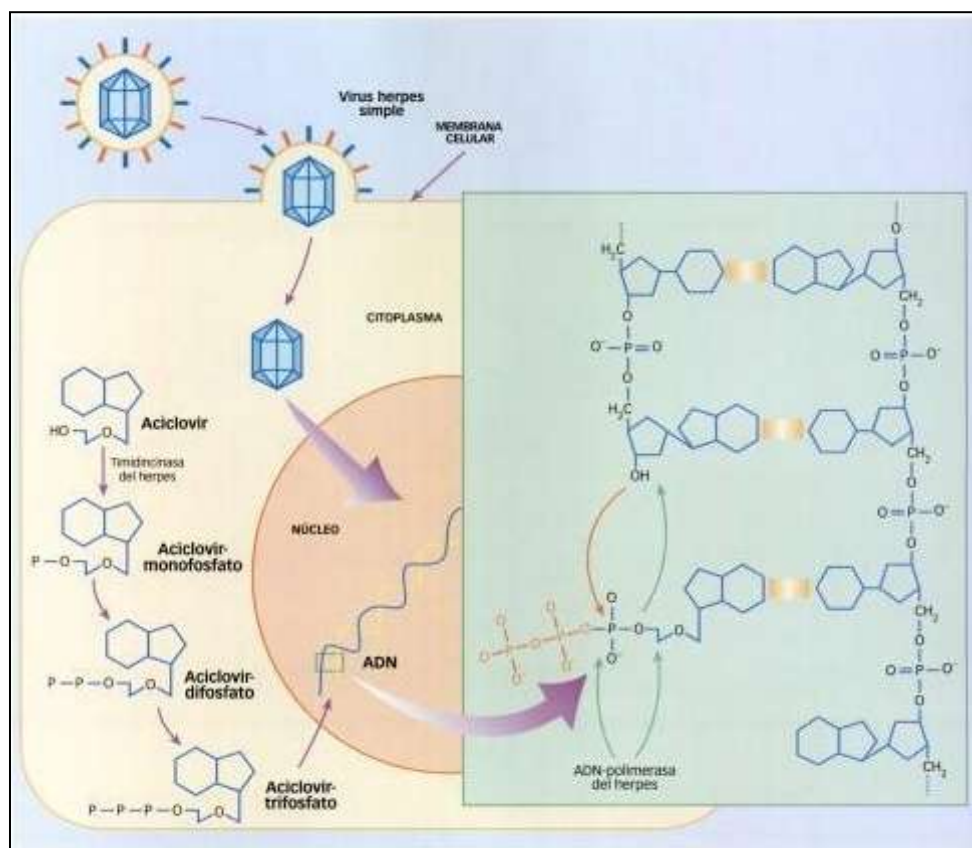


Figura 2. Mecanismo de Acción del ACV.

La forma activa del ACV que inhibe selectivamente el virus del herpes simplex se debe a tres propiedades (22):

- I. Se concentra selectivamente en las células infectadas por el virus debido a la acción catalítica de la enzima viral timidina–quinasa.
- II. La molécula activa, ACV trifosfato, tiene una mayor afinidad por la ADN–polimerasa del virus que por la ADN–Polimerasa celular, dando como resultado una inhibición competitiva selectiva de la enzima.
- III. Se forma un complejo entre ACV trifosfato incorporado a la cadena de ADN–elongada y la ADN–polimerasa viral, que inactiva irreversiblemente la enzima.

El ACV–trifosfato es capaz de inhibir la replicación vírica por tres vías:

- a) Inhibiendo selectivamente la ADN polimerasa viral.
- b) Mediante la competencia del ACV–trifosfato con la guanosina–trifosfato por incorporarse al ADN viral.
- c) Actuando como finalizador de cadena al incorporarse al ADN viral.

Es importante señalar que el ACV trifosfato también inhibe la ADN polimerasa celular y lo hace en menor grado que en el caso de la polimerasa viral (22 y23).

Durante el uso prolongado de ACV en pacientes inmuno-comprometidos (VIH/SIDA) se han observado infecciones por virus del herpes simplex ACV-resistentes a través de la mutación en el gen que codifica la timidina-quinasa y la ADN-polimerasa. La mayor parte de las cepas de virus del herpes simplex ACV-resistentes han perdido la capacidad de fosforilar el ACV debido a alteraciones en la timidina-quinasa. La timidina-quinasa puede ser indetectable (cepas timidina-quinasa negativas), o con menor frecuencia puede ser detectable (cepas timidina-quinasa positiva), pero su afinidad por el sustrato está alterada. Finalmente, existen raros mutantes con una actividad timidina-quinasa normal, pero con alteración de la actividad de ADN-polimerasa viral al ACV-trifosfato, esto debido a múltiples mutaciones en el gen que codifica la timidina quinasa y la ADN-polimerasa (5, 24, 25 y 26).

Además del ACV, existen otros fármacos con actividad antiherpética, sin embargo tienen el mismo mecanismo de acción que el ACV por lo que no presentan actividad contra cepas ACV resistentes o tienen una significativa toxicidad por lo que su uso es limitado. Como consecuencia de todo lo anterior existe una creciente conciencia de la necesidad de nuevos fármacos antiherpéticos contra cepas ACV resistentes y con diferente mecanismo de acción que el ACV (27).

1.2 Plantas Medicinales.

Desde tiempos prehispánicos en América se reconocían las propiedades y ventajas de las plantas medicinales en la salud del hombre (28). Conforme al pasar de los años, se observó que las plantas medicinales exhibe una gran variedad de actividades biológicas tales como antioxidantes (29), anticancerígenos (30), antibacterianos (31), antifúngicos (32) y antivirales (33). Estas actividades se deben a la presencia de metabolitos secundarios en las plantas (34). Los Metabolitos Secundarios son compuestos químicos sintetizados por las plantas, característicos de un rango limitado de especies, dichos metabolitos secundarios tienen un atractivo interés terapéutico, debido a que muchos tienen efecto biológico sobre otros organismos (35).

En el 2005 aproximadamente el 85% de la población mundial (5.2 billones de 6.1 millones), utilizaba como primer recurso alguna planta medicinal para el cuidado de su salud (36). Además del uso de las plantas en la medicina alternativa, éstas pueden someterse a diversos procesos de extracción y separación con la finalidad de aislar compuestos con actividad terapéutica y ser utilizados posteriormente por la medicina alópata. Es importante señalar, que más de la mitad de los fármacos introducidos al mercado entre el periodo de 1981 a 2002, provienen de plantas medicinales; y es justamente antes de este periodo cuando la investigación de productos naturales como fuente de nuevos fármacos alcanzó su auge (37 y 38). Además de lo anterior los compuestos contenidos en plantas medicinales, pueden servir como precursores para

facilitar el desarrollo de nuevos compuestos con similar o mayor actividad terapéutica, esto mediante la investigación de la relación estructura-actividad. (39, 40 y 41).

Existen antecedentes de extractos y de compuestos de origen natural que inhiben la replicación *in vitro* del virus del herpes simplex. En 1992, Amoros et al, investigaron la actividad *in vitro* contra VHS-1 de flavonoides aislados e identificados del propóleo (42). En general encontraron que los flavonoles son más activos que las flavonas y que existe sinergismo cuando se combinan ambos tipos de compuestos, lo cual explica el hecho de que el propóleo resultó con mayor actividad que cada compuesto de forma individual. Por otro lado, Meyer en 1996, reportó la actividad antiviral contra VHS-1 en el extracto acuoso de *Helichrysum aureonitens*, planta africana medicinal con propiedades antibacterianas previamente reportadas (43). Nolkemper en el 2006, evaluó el efecto antiviral contra VHS-1 y VHS-2, en los extractos acuosos de diversas plantas pertenecientes a la familia Lamiaceae, entre las cuales incluyeron a *Salvia officinalis*, que reveló una actividad antiviral contra ambos virus *in vitro* (44). Likhitwitayawuid en el 2005, reportó un estudio en el que se evaluó el efecto inhibitorio contra VHS-1 y VHS-2 de veinticinco compuestos de tipo fenólico, dentro de los cuales cinco fueron flavonoides y dos estilbenos diméricos obtenidos de *Artocarpus gomezianus*, cinco derivados del fluoroglucinol obtenidos de *Mallotus pallidus* y trece coumarinas obtenidos de *Triphasia triflora*. Cinco de estos compuestos presentaron actividad antiviral, determinada mediante el método de reducción de placa (45). Así mismo se han reportado plantas que presentan actividad antimicrobiana, que llegan a presentar también actividad antiviral incluyendo VHS-1

y VHS-2 (46). Por último se reportó que el extracto acuoso de *J. curcas*, inhibe fuertemente el efecto citopático inducido por VIH con una baja citotoxicidad. A partir del extracto acuoso de *J. curcas*, se aisló la Curcaciclina B, un nonapéptido cíclico que incrementa la acción de la rotamasa de la ciclofilina B humana (47).

Gracias a los mencionados beneficios de las plantas, se puede contar con grandes probabilidades de encontrar compuestos con actividad contra el virus del herpes simplex, pero esto no significa que el trabajo sea sencillo, puesto que por lo general para poder aislar un compuesto con actividad se necesita seguir una serie de etapas:

- Selección, colección, identificación botánica y preparación del material de la planta.
- Extracción con disolventes apropiados y análisis preliminares.
- Determinar mediante bioensayos si el extracto es activo o no.
- Uso de diversas técnicas de separación para la obtención de constituyentes puros bioactivos guiados por bioensayos.
- Determinación estructural de compuestos puros obtenidos.
- Análisis y perfiles farmacológicos de compuestos puros y pruebas toxicológicas
- Síntesis parcial o total y preparación de derivados relacionados con estructura y actividad.

Todos estos pasos pueden ser observados en el siguiente diagrama de flujo (Figura 3) para llevar a cabo un aislamiento Biodirigido (48 y 49):

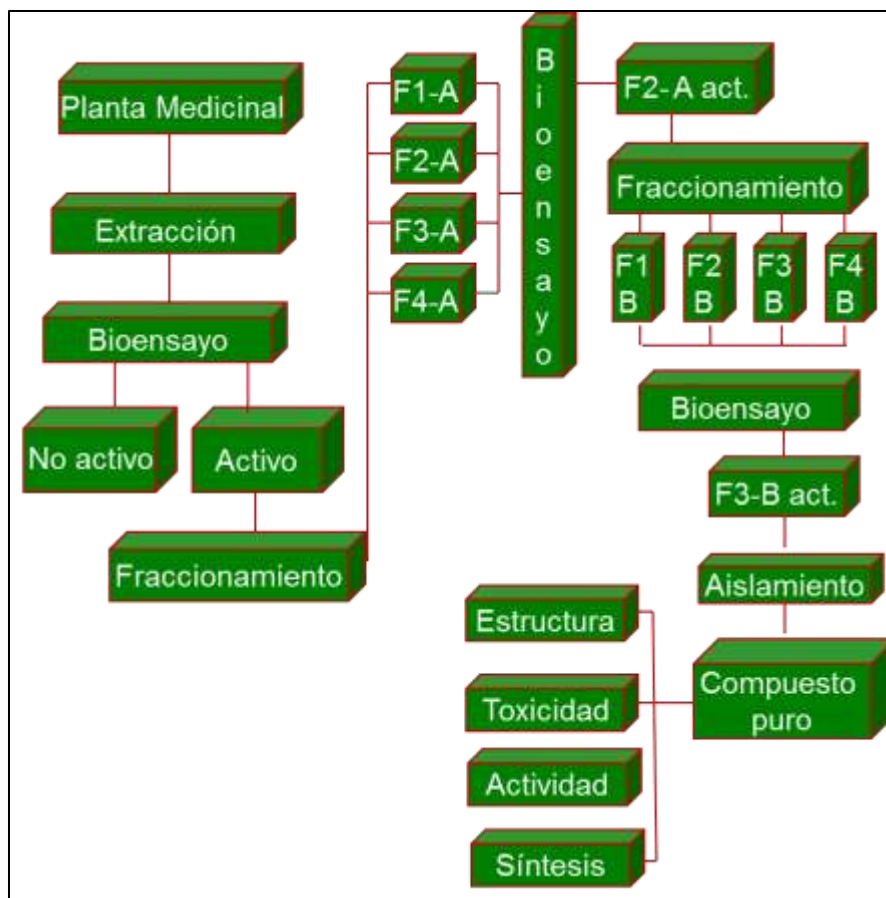


Figura 3. Diagrama de Flujo para el Aislamiento Biodirigido de Compuestos con Actividad Biológica.

1.3 Plantas de Estudio.

Como se mostró en el diagrama anterior el primer paso para llevar a cabo el aislamiento biodirigido, es la selección adecuada las plantas que se utilizaron para el trabajo. Para esta selección, se consideraron los antecedentes etnofarmacológicos y quimiotaxonómicos, que nos indicaron cuáles plantas de la región fueron candidatas para utilizarse en el aislamiento.

Tal es el caso de *Jatropha dioica*, la cual es un arbusto de flores pequeñas poco vistosas, de 30 a 60 centímetros de altura, con tallos negro-rojizos y raíces tuberosas que al ser cortadas brota un líquido semejante a la sangre; por esto la población la conoce como “sangre de drago” o “sangre de grado”. La planta se encuentra en varios municipios del estado de Nuevo León y además en San Luis Potosí, Chihuahua, Coahuila, Estado de México, Hidalgo y Guanajuato. El hábitat de esta especie es en climas secos, con suelos pedregosos sobre las sierras, es una especie capaz de crecer en zonas en donde es difícil el crecimiento de otras plantas. *J. dioica* pertenece a la familia de las Euphorbiaceae, dicha familia es ampliamente conocida por ser una fuente promisoría de metabolitos secundarios con amplias propiedades terapéuticas, entre las cuales se encontró la actividad contra VHS, así mismo el género *Jatropha* comprende cerca de 200 especies que se encuentran ampliamente distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales de América y Asia. Es una de las fuentes más ricas de fitoquímicos tales como alcaloides, flavonoides, lignanos, péptidos tricíclicos,

fitoesteroles y terpenos con un amplio rango de actividades biológicas como; antitumoral, citotóxica, antibacteriana, anti-inflamatoria, molusquicida, insecticida, fungicida y antiviral. Existen diversos reportes de estudios de los constituyentes químicos y actividades biológicas de plantas de este género (50, 51, 52, 53, 54, 55 y 56). En la medicina tradicional *J. dioica* es utilizada en comunidades rurales para tratar infecciones bacterianas, micóticas, virales, periodontitis, salpullido y alopecia (54 y 57). En la literatura se reportan extractos de *J. dioica* que presentan actividad antibacteriana, antifúngica y citotóxica (51, 57, 58, 59 y 60), y por otro lado se reporta el aislamiento de varios compuestos como el β -sitosterol, jatrophatriona, citlaltiriona y riolozatriona (61 y 62), sin embargo no se tienen reportes que evalúen su actividad antiviral.

Por otra parte la Lamiaceae, es una familia que hay que destacar por su amplia actividad antiviral (38), dentro de estas plantas sobresale *S. officinalis*. En la literatura se reportan extractos de *S. officinalis* con actividad en contra de VHS-1 y VHS-2, por lo que se puede esperar que especies de la familia Lamiaceae y del género *Salvia*, presentes en nuestra región pueden contener compuestos con actividad antiherpética, tal es el caso de *Salvia ballotaeflora* y *Salvia texana* (63 y 64).

S. ballotaeflora, es un arbusto también conocida como mejorana, es aromático mide dos metros de alto, con hojas al frente de márgenes serrados de uno a cuatro cm de largo, las flores son cortas de color azul o purpura en forma de racimos y alargadas, se

encuentran frecuentemente sobre tierras arenosas y arcillosas, usada como condimento y se localiza en una pequeña área geográfica en el valle de Texas, pero también se ha observado en el noreste del México. Sin embargo esta planta se considera de crecimiento limitado ya que es rara y escasa, además de que no se encontró ningún reporte de actividad en la literatura de esta especie, además como se mencionó anteriormente esta planta pertenece a la familia Lamiaceae y al género *Salvia*, por lo que se consideró interesante evaluar su actividad antiviral (65, 66 y 67).

Por último, *S. texana* o también conocida como salvia azul o sabia azul, es una planta perene de 30 cm de alto, con hojas lanceoladas de una a siete cm de largo, las flores son racimos frondosos de color purpura azul oscuro. Su localización geográfica es en Texas, Coahuila, Nuevo León y otras partes del noreste de México (65 y 68). Existen reportes sobre el aislamiento de un sesquiterpeno y tres quinonas diterpénicas de *S. texana* (69 y 70), así como de la actividad antimicótica y antibacteriana que caracteriza este género (60); sin embargo, no encontraron reportes de actividad antiviral de la planta, por lo que se consideró importante evaluar también su actividad antiviral.

1.4 Evaluación de Actividad Citotóxica y Antiviral.

Para la depuración de la actividad biológica de plantas es crucial el bioensayo para su monitoreo, el cual debe ser elegido en función de la sensibilidad, fiabilidad y recursos del investigador.

La evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* incluye: aislamiento de células, incubación de las células con el compuesto a evaluar, medición de la sobrevivencia celular y finalmente la interpretación de los resultados. La tinción con azul tripano es un ensayo común para evaluar la integridad de la membrana celular, asumiendo la proliferación o muerte celular, sin embargo; el método no es sensible y es poco confiable. El ensayo colorimétrico con Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por otro lado, es un método de mayor sensibilidad y confianza que determina la proliferación, viabilidad y activación celular. Fue desarrollado por Mosmann en 1983, siendo modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang. Este análisis se basa en la conversión de la sal de MTT, un sustrato de color amarillo claro, a cristales de formazán, un producto de color púrpura. La reacción de reducción celular implica los cofactores de nucleótidos de piridina $\text{NAD}^+/\text{NADPH}$ y la enzima mitocondrial deshidrogenasa, que solo ocurre en las células vivas. El producto de formazán es impermeable a la membrana celular, acumulándose dentro de la célula. Los cristales de formazán salen de la célula cuando se agregan a un agente lisante (DMSO), permitiendo la cuantificación del producto formado. La intensidad del

producto medido a 550–620 nm es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo, esta intensidad se compara con la de las células sin tratar (control). La actividad citotóxica se expresó como la concentración del compuesto evaluado, en la cual disminuyó el 50% de la viabilidad celular (TC_{50}) comparada con el control, mediante una curva dosis respuesta (71,72 y 73).

Existen diferentes tipos de bioensayos que evalúan la susceptibilidad del virus del herpes simplex contra compuestos antivirales. Los bioensayos más comunes incluyen el método de captación de colorante, método inmuno-enzimático y el método de hibridación de DNA, sin embargo; el método de reducción de placas fue el primero y continua siendo estándar de referencia para nuevos métodos (74 y 75). El principio del método de reducción de placa consiste en la inhibición del efecto citopático inducido por la infección viral, y por consecuencia la inhibición de la formación de las placas virales en presencia de un agente antiviral. Previamente al ensayo, se debe inocular con una cantidad conocida de partículas virales, que desarrollaran unidades formadoras de placas (UFP) en una monocapa de células viables, posteriormente debe adicionarse el compuesto antiviral a evaluar, y posteriormente de un tiempo apropiado de incubación (48 a 72 h), las placas formadas son fijadas y teñidas, la monocapa es examinada y se hace el conteo de numero de placas que permitió formar el compuesto antiviral. La actividad antiherpética se expresó, como la concentración del compuesto evaluado, en la que se observó la reducción del 50% de la formación de UFP (IC_{50}), comparado contra el 100% de formación del control negativo, mediante el método que describió Reed y Munch en 1938 (75, 76 y 77).

1.5 Justificación.

Debido a la necesidad de obtener nuevos agentes antivirales contra VHS-1 y VHS-2, y a que existen antecedentes etnofarmacológicos de actividad antiviral, en el caso *J. dioica*, además de criterios quimiotaxonómicos en el caso de *J. dioica*, *S. ballotaeflora* y *S. texana*, es importante la búsqueda, aislamiento e identificación de compuestos anti herpéticos en estas plantas.

1.6 Objetivo General.

Aislar y caracterizar al menos un compuesto con actividad antiviral contra VHS-1 y VHS-2, a partir del extracto de una de las plantas incluidas en este trabajo, la cual se seleccionará de acuerdo a su potencial biológico mediante un modelo de infección celular *in vitro*.

1.7 Objetivos Específicos.

1. Evaluar la actividad citotóxica en células Vero, de los extractos hidroalcohólicos de *J. dioica*, *S. ballotaeflora* y *S. texana*.
2. Evaluar la actividad antiviral en células Vero mediante la técnica de reducción de placa de los extractos que resulten no tóxicos.
3. Realizar el aislamiento biodirigido de al menos un compuesto con actividad antiviral a partir del extracto seleccionado.
4. Realizar la caracterización estructural del compuesto aislado.
5. Determinar en células Vero la concentración citotóxica y antiviral del compuesto obtenido.

CAPITULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material, Equipo y Reactivos.

2.1.1 Material.

2.1.1.1 Material de Laboratorio.

- Puntillas 100 μ L, 1000 μ L, 200 μ L estériles con filtro
- Pipetas automáticas Transferpette[®] y Eppendorf[®] de 1, 10, 200 y 1000 μ L
- Acrodiscos PVDF 45 mm de diámetro con filtro de 0.22 μ m Millipore[®]

- Microplacas estériles de poliestireno de 96 pozos de fondo plano Costar[®]
- Cromatofolios AL CCF de Silicagel 60 F₂₅₄ Merck[®]
- Columna Lobar LiChroprep[®] RP-18 (240–10 mm), Merck[®]
- Columna Lobar LiChroprep[®] RP-18 (310–25 mm), Merck[®]
- ColumnaChromolith performance RP-18 (100 – 4.6 mm), Merck
- Columna: HP-5ms (30 m x 0.25 mm d.i., 0.25 µm film thickness)
- Silicagel 60 de tamaño de partícula 0.2–0.5mm, Merck[®]
- Cromatofolios: AL TLC de Silicagel 60 F₂₅₄ Merck 5 cm x 3 cm.
- Silica gel (0.04-0.063µm) Aldrich[®]
- Matraces Erlenmeyer Pyrex[®] de 250, 500 y 1000 mL
- Matraces bola de 250, 500 y 1000 mL con esmeril 24/40
- Vasos de precipitado
- Probeta de 10, 25 50, 100, y 250mL
- Pinzas de disección
- Pinzas tres dedos
- Probetas de 10, 50, 250 y 500 mL
- Embudos de separación de 250 y 1000 mL
- Embudo de separación rápida
- Filtros Whatman[®] 40
- Pipetas lineales de 5 y 10 mL
- Pipetas Pasteur
- Placas de porcelana 12 pozos
- Placa de 6 pozos fondo plano CORNING[®]

- Pomaderas de vidrio oscuras
- Viales de vidrio oscuros de 2 y 5 mL
- Tubos de ensaye 13 X 100, 18 X 150 mm
- Tubos con tapón de rosca 13 X 100 mm
- Tubos eppendorf de 0.6 y 2 mL
- Botellas de 25, 75 y 175cm² forma inclinada con tapón de rosca CORNING[®]
- Tubos cónicos 15 y 50 mL CORNING[®]
- Pipetas serológicas desechables 1, 2, 5 y 10mL CORNING[®]
- Cubas CAMAG para cromatografías TLC 21 X 5 X 10 cm
- Cubas CAMAG para cromatografías TLC 13 X 8 X 10 cm
- Capilares de 2, 5 y 10 µLDrummonWiretrol[®]
- Cajas Petri desechables de plástico Medegen 15 X 100 mm
- Jeringas 1 y 5 mL Becton –Dickinson[®]
- Papel filtro Whatman[®]No 40
- Frascos con rosca de vidrio de 100 mL
- Jeringa de Vidrio Lucer- LOH 5 mL Yale[®]
- Espátulas para polvos
- Gradilla para 60 tubos

2.1.1.2 Material Biológico.

- Células epiteliales de riñón de mono verde africano *Chlorocebus sabaeus* (Vero)
Donadas por el Dr. Miguel Dector, del departamento de Genética de la Facultad de medicina, UANL.

- Aislado clínico de VHS-1, obtenidas en el Departamento de Dermatología del Hospital Universitario de la Facultad de Medicina de la UANL, cepa positiva para el gen de timidina–quinasa (*tk*) de VHS-1 mediante el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Aislado clínico de VHS-2, obtenidas en la facultad de Odontología de la UANL, cepa positiva para el gen de timidina–quinasa (*tk*) de VHS-2 mediante PCR.
- Raíz de la planta *Jatropha dioica* (UAN-24077).
- Parte aérea de la planta *Salvia ballotaeflora* (UAN-15925).
- Parte aérea de la planta *Salvia texana* (UAN-22298).

2.1.2 Equipo.

- Licuadora OSTERIZER[®] de 2 L
- Balanza granataria ScoutOhaus[®]
- Balanza analítica AND[®] modelo GR-120
- Rotavapor BÜCHI[®] modelo 461 con baño de agua BÜCHI RE 121
- Rotavapor Laborota 4000 marca Heidolph
- Bomba de vacío Emerson[®] S55N H.P. 1/3
- Sistema refrigerante modelo K20 y recirculador modelo DC1 marca Haake[®]
- Bomba de vacío 2025 marca Welch[®]
- Bomba peristáltica Bio Rad EP 1 EconoPump
- Colector Automático de Muestras Bio Rad[®] 2128
- Centrifuga IEC[®] Micro MB

- Ultrasonido modelo 2510 marca Branson[®]
- Desecador con Adaptador para Vacío Pyrex[®]
- Autoclave MarketForge[®] Sterilmatic
- Campana de Flujo laminar
- Campana de Extracción Lumistell[®] CEE 120
- Placa de Calentamiento digital Cimarel[®]
- Incubadora con CO₂
- Estufa Shel Lab[®] 1305U
- Refrigerador Daewoo[®] DFR N141D
- Agitador Heidolph Instruments[®] Unimax 1010
- Agitador de tubos eppendorf Ika MS1
- Congelador Vertical Magic Chef[®]
- Lámpara de LUV Spectroline[®] ENF 260C
- Espectrómetro Sequoia Turner[®] 390
- Polarímetro Perkin Elmer Modelo 341
- Cromatógrafo de Líquidos (CLAR) Waters[®] con bomba Modelo 600, detector arreglo de diodos 2996, automuestreador Waters[®] 717 plus
- Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N acoplado a un espectrómetro de masas selectivo 5973 INERT
- Espectrómetro de Infrarrojo (IR)/ATR Perkin Elmer Modelo Spectrum 100
- Espectrómetro RMN Bruker Modelo Avance DPX400, de 9.4 Teslas de campo magnético, operado a frecuencia para ¹H de 400.13 MHz y para ¹³C de 100.61,

con temperatura controlada por la unidad Eurotherm Bruker, equipado con una sonda de detección directa de 5 mm.

2.1.3 Reactivos.

2.1.3.1 Disolventes.

- Metanol grado analítico, Fermont[®]
- Metanol grado CLAR, Fermont[®]
- Hexano grado analítico, Fermont[®]
- Éter etílico grado analítico, Fermont[®]
- Acetato de etilo grado analítico, Fermont[®]
- Butanol grado analítico, Fermont[®]
- Ácido acético glacial grado analítico, Fermont[®]
- Etanol grado analítico, Fermont[®]
- Dimetil sulfóxido (DMSO), Fisher Scientific^{®®}
- Cloroformo, Fermont[®]
- Metanol-*d*4 99.98 % deuterado, Aldrich[®]
- Cloroformo-*d* 99.8 % deuterado Aldrich[®]
- Agua destilada

2.1.3.2 Reactivos Especiales.

- Bromuro de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio, Research Organics[®]
- Dodecilsulfato sódico SDS Calbiochem[®]
- Suero Bovino Fetal (FBS,CERT,USA ORIGIN) Invitrogen[®]
- Tripsina 0.25% Invitrogen[®]
- Aminoácidos no esenciales (MEM NEAA,100x) Invitrogen[®]
- L-Glutamina Invitrogen[®]
- Inmunoglobulina Humana Normal (IgG) Flegogamma
- Buffer Fosfato Salino (PBS) Invitrogen[®]
- Colorante de Giemsa Aldrich[®]
- ACV Marca Laciken[®]
- Advanced-DMEM (Medio Eagles Modificación De Dulbecco) Gibco[®]

2.2 Métodos.

2.2.1 Colecta de Plantas.

La colecta de *J. dioica* se llevó a cabo en el mes de Junio del 2004 en Villaldama, N.L. La colecta de *S. texana* se llevó a cabo en el mes de Diciembre del 2004 y en Octubre del 2005 en Escobedo, N.L. La colecta de *S. ballotaeflora* se llevó a cabo en el mes de Mayo del 2004 y en Noviembre 2004 en Villaldama, N.L. Especímenes de cada planta fueron enviados al Herbario Institucional de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL para su identificación y comprobación de especie.

Se realizó enjuague con agua a presión de las plantas colectadas, se retiraron excesos de tierra. Las plantas *S. ballotaeflora* y *S. texana* fueron puestas a secar a temperatura ambiente por dos semanas, una vez concluido este periodo fueron molidas. Debido a que el grosor de las raíces de *J. dioica*, no permitía la sequedad rápida provocando la formación de hongos, la raíz de *J. dioica* fue molida y posteriormente puesta a secar a temperatura ambiente.

2.2.2 Obtención de Extractos Hidroalcohólicos.

Por cada 50 g del material molido y seco de planta se utilizaron 600 mL de Metanol/Agua (90:10), la extracción se llevó a cabo con agitación constante durante una hora a temperatura ambiente en tres repeticiones. Los extractos se filtraron y fueron llevados a sequedad por evaporación del solvente hidroalcohólico, a presión reducida y a

temperatura de 37 °C. Se obtuvieron extractos hidroalcohólicos viscosos de color oro marrón oscuro, estos se colocaron en frascos ámbar y finalmente se mantuvieron en refrigeración (4 °C). Se calculó el porcentaje de recuperación para cada uno de los extractos.

2.2.3 Cultivo de Células.

Células Vero fueron cultivadas en monocapa a una confluencia 80-90% a 37 °C, en una atmósfera de 5% de CO₂ en placas de 6 o 96 pozos respectivamente. Las células fueron cultivadas en medio advanced-DMEM suplementado con suero fetal bovino al 2%, glutamina, aminoácidos esenciales, estreptomicina y penicilina al 1%. Estas células fueron utilizadas en las secciones 2.2.5, 2.2.6 y 2.2.7

2.2.4 Preparación de Extractos, Fracciones y/o Compuesto para la Determinación de la Actividad Biológica.

Para los experimentos de citotoxicidad y actividad anti-herpética, dos mg de extractos, fracciones o compuesto aislado CSG4-F2 de *J. dioica* se disolvieron con dos mL de medio de cultivo advanced-DMEM, al 1% de DMSO para obtener una concentración de 1,000 µg/mL. Las diferentes concentraciones utilizadas en 2.2.5 y 2.2.7 fueron preparadas a partir de esta solución. Para la determinación del porcentaje de reducción de UFP de extractos diferenciales y fracciones se determinó a una concentración de 250 µg/mL.

2.2.5 Evaluación de la Actividad Citotóxica (TC₅₀).

Se llevaron a cabo los ensayos de citotoxicidad, se sembraron 700 células por pozo en una placa de 96 pocillos con medio Advanced-DMEM suplementado, se incubaron 24 h a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂, se retiró el sobrenadante y se reemplazó con medio fresco con diferentes concentraciones de extractos hidroalcohólicos, diferenciales o compuesto aislado (125, 250, 500 y 1,000 µg/mL) y se incubaron nuevamente por 72 h. Este experimento se llevó a cabo por triplicado para cada extracto. Se utilizó como control negativo células Vero sin exponer al extracto o compuesto aislado. Después de tres días de incubación, la viabilidad celular se determinó mediante la adición de 10 µL de una solución de 5 mg/mL de MTT por pozo, se incubaron 3 h a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. El medio de cultivo fue removido, 200 µL de DMSO se añadieron para disolver los cristales de formazán y se midió la absorbancia a 570 nm. Posteriormente se graficaron curvas de dosis respuesta de las diferentes concentraciones utilizadas. La TC₅₀ se determinó como la concentración de extracto, necesario para reducir la viabilidad celular en un 50%, tomando como 100% de viabilidad celular el control negativo.

Se seleccionó aquella planta con menor citotoxicidad empleando el modelo antes descrito, para la determinación de la actividad antiviral.

2.2.6 Determinación del Título Viral del Concentrado Viral de VHS-1 y VHS-2.

El título viral (concentración de UFP/mL) se realizó mediante diluciones seriadas Log10 de un concentrado viral obtenido del aislado clínico. En una serie de tubos se adicionaron 9 mL de PBS glucosado al 1% a 10 tubos 25 x 250 con tapón de aluminio, se introdujeron en hielo, se enumeraron los tubos del 1 al 10, se tomó 1 mL de la solución de concentrado viral de VHS-1 o VHS-2 respectivamente y se depositó en el tubo # 1, se agitó y a partir de este tubo se hicieron diluciones logarítmicas (1:10) hasta el tubo # 10 como se muestra en la figura 4. A cada tubo le correspondió un factor de dilución (FD) como se muestra en la tabla 8. Se sembraron 500,000 células Vero por pocillo en 2 placas de 6 pozos, se depositó 1mL de cada tubo marcado en su pozo correspondiente y se incubó durante 1 h, a 37 °C en agitación constante. A continuación, el sobrenadante se desechó y se agregó medio fresco advanced-DMEM suplementado con DMSO al 1% y 0.32% de IgG. Las células se incubaron 72 h. Se utilizaron controles de crecimiento celular (CC) y control negativo (Mock). Por último, las células en los pozos se fijaron con 2 mL de metanol y se tiñeron con 1 mL de Giemsa. Se realizó conteo de placas formadas y se determina en cuál de los pozos se obtiene la cantidad inmediata superior a 100 UFP (“tubo título” ó “pozo “título”). Se determinó la concentración de UFP/mL mediante la siguiente fórmula:

$$\text{UFP contadas en “pozo titulo”/FD del “tubo titulo”} = \text{Conc. de UFP/mL}$$

El volumen necesario del “tubo titulo” para obtener 100 UFP de VHS-1 y VHS-2 respectivamente, fue calculado mediante proporcionalidad con la siguiente fórmula:

$$100 \text{ UFP} / \text{No. de UFP contadas en el “pozo titulo”} = \text{mL necesarios del “tubo titulo”}$$

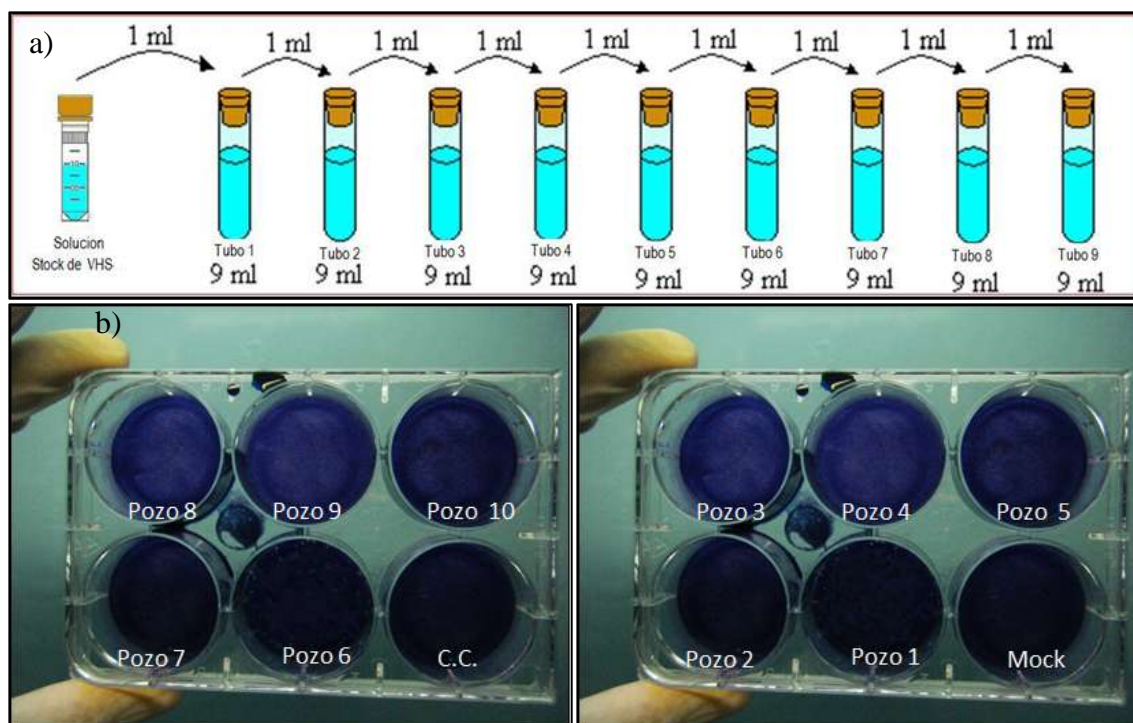


Figura 4. a) Gráfica de Tubos Utilizados para las Diluciones Logarítmicas del Stock Viral. b) Fotografía de Placas de Seis Pozos Correspondientes a los Tubos de Dilución.

2.2.7 Evaluación de la Actividad Antiherpética.

2.2.7.1 Determinación del IC₅₀.

2.2.7.1.1 Determinación del IC₅₀ de Extractos Hidroalcohólicos, Diferenciales y Compuesto Aislado CSG4-F2. La actividad anti-herpética, se determinó utilizando el ensayo de reducción de placas. Se sembraron 500,000 células Vero por pocillo en placa de 6 pozos y se incubaron con 100 UFP del VHS-1 o VHS-2 durante 1 h, a 37 °C en agitación constante. Posteriormente, el sobrenadante se desechó y se agregó medio fresco advanced-DMEM suplementado con DMSO al 1% y 0.32% de IgG. Se añadieron a las placas concentraciones de 125, 250 y 500 µg/mL del extracto hidroalcohólico, diferenciales o compuesto aislado CSG4-F2 de *J. dioica* esterilizados por filtración. Las células se incubaron 72 h. Se utilizaron para los ensayos controles de crecimiento celular, control negativo (Mock) y células Vero infectadas y tratadas con ACV a una concentración de 0.5 µg/mL como control positivo. Por último, las células se fijaron con 2 mL de metanol y se tiñeron con 1 mL de Giemsa. La IC₅₀ se determinó como la concentración en la que se observó reducción del 50% de la formación de UFP comparado contra el 0% de reducción del control negativo, todos los ensayos se realizaron por triplicado.

2.2.7.1.2 Determinación del IC₅₀ del ACV. El ACV fue adquirido de los Laboratorios Kendrick (Laciken). Se determinó la IC₅₀ de ACV como se describió en la sección anterior (Sección 2.2.7.1.1) a las concentraciones de 2, 1 y 0.5 µg/mL.

2.2.7.2 Determinación del porcentaje de reducción de placas a la concentración de 250 µg/mL.

Para los extractos diferenciales y las fracciones obtenidas de las columnas CLFR-29 y CSG-4, se determinó el porcentaje de reducción de placas. La metodología fue igual a la descrita en la sección 2.2.7.1.1, con la diferencia que se determinó el porcentaje de reducción de la formación de UFP, a la concentración de 250 µg/mL comparado contra el 0% de reducción de placas del control negativo.

2.2.8 Determinación del Índice de Selectividad.

Se determinó el índice de selectividad del extracto hidroalcohólico, extractos diferenciales y compuesto aislado CSG4-F2 de *J. dioica* mediante la división de la IC₅₀ entre la TC₅₀.

2.2.9 Fraccionamiento Biodirigido de Extracto Hidroalcohólico de *J. dioica*.

2.2.9.1 Extracción Diferencial de *J. dioica*.

Se realizaron particiones líquido-líquido del extractos hidroalcohólico de *J. dioica* con solventes de diferente polaridad; para ello se pesaron 40 g del extracto hidroalcohólico, se disolvieron con 400 mL de una solución metanol:agua destilada (90:10), se realizó la partición con hexano (3 X 100 mL), acetato de etilo (3 X 100 mL), butanol (3 X 100 mL) y finalmente se recuperó el residuo acuoso.

Los extractos de hexano, acetato de etilo, butanol y residuo, se evaporaron a sequedad a presión reducida a 37 °C, se mantuvieron en frascos oscuros de vidrio a 4 °C hasta su uso en ambiente de nitrógeno.

Se calculó el porcentaje de recuperación, actividad citotóxica (Sección 2.2.5), antiherpética (Sección 2.2.7.1) e índice de selectividad (Sección 2.2.8) de cada extracto.

2.2.9.2 Fraccionamiento Biodirigido del Residuo Acuoso.

2.2.9.2.1 Condiciones de Elución para Columna Cromatográfica CLFR29.

Condiciones utilizadas para columna Lobar LiChroprep® RP-18 (310–25 mm), Merck® (Tabla 2) con Flujo de 3 mL/ min.

TABLA 2. Sistema de eluentes utilizado para CLFR29.

% Agua	% Metanol	Volumen Utilizado mL
99	1	150
80	20	120
50	50	120

2.2.9.2.2 Inyección de Residuo Acuoso en Columna Cromatográfica CLFR29. Se continuó el aislamiento con el residuo acuoso. Se sembró aproximadamente 0.2 g de este extracto en una columna lobar RP-18 (310 x 25), se eluyó con el gradiente de la tabla 2 (Sección 2.2.9.2.1). Las fracciones obtenidas se analizaron por cromatografía en capa fina y CLAR analítico (Secciones 2.2.9.2.3 y 2.2.9.2.4 respectivamente). Se calculó el porcentaje de recuperación (Tabla 15) y actividad antiherpética (Sección 2.2.7.2) de cada fracción.

2.2.9.2.3 Sistemas de Elución de Capa Fina para Residuo Acuoso. Se utilizaron cromatofolios AL TLC de Silicagel 60 F₂₅₄ Merck[®], se utilizaron 30 mL con 5 min de saturación de la cuba, con el siguiente sistema de eluentes:

Metanol / Acetato de etilo (9:1).

2.2.9.2.4 Condiciones de Elución para CLAR. En la tabla 3 se muestran las condiciones de trabajo para el equipo CLAR Waters bomba 600, detector arreglo de diodos 2996:

TABLA 3. Porcentaje de los solventes utilizados en el gradiente de elución.

Tiempo	% Agua	% Metanol
0.0	90	10
3.0	90	10
14.0	60	40
15.0	52	48
23.0	49	51
24.0	48	52
41.0	0	100
50.0	0	100

Columna:	Chromolith FR-18 Merck
Flujo:	1.0 mL/min.
Volumen de inyección:	10 µL
Tiempo de corrida:	50 min
Longitud de onda:	254nm

2.2.9.3 Fraccionamiento Biodirigido del Extracto Hexánico.

2.2.9.3.1 Condiciones de Elución para Columna Cromatográfica CSG4.

Condiciones utilizadas para columna de silica gel CSG4:

Fase Móvil: Hexano/ Acetato de etilo (60:40)

Flujo: 3 mL/ min

2.2.9.3.2 Inyección de extracto diferencial Hexánico en Columna Cromatográfica

CLFR29. Se continuó el aislamiento con el extracto hexánico. Se aplicó aproximadamente 1 g de este extracto en una columna de silica gel Aldrich® (150 x 13), se eluyó con el gradiente de la sección 2.2.4 hasta la obtención de las fracciones. Las fracciones obtenidas se analizan por CLAR analítico y cromatografía en capa fina (Secciones 2.2.9.2.3 y 2.2.9.3.3 respectivamente).

Se calculó el porcentaje de recuperación (Tabla 17) y actividad antiherpética (sección 2.2.7.2) de cada fracción. Se calculó la citotoxicidad (Sección 2.2.11) e índice de selectividad del compuesto aislado CSG4-F2.

2.2.9.3.3 Sistemas de Elución de Capa Fina para Extracto Diferencial Hexánico.

Se utilizaron cromatofolios AL TLC de Silica gel 60 F₂₅₄ Merck®, se utilizaron 30 mL con 5 min de saturación de la cuba, con el siguiente sistema de eluentes: Hexano/ Acetato de etilo (60:40).

2.2.10 Análisis de Pureza Cromatográfica del Compuesto Aislado.

Se disolvió CSG4-F2 en metanol y se inyectó por CLAR analítico (Sección 2.2.9.2.4), se realizó un barrido de UV-Visible del pico observado para la búsqueda de impurezas. Además CSG4-F2 se disolvió en hexano, se analizó por Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N acoplado a un espectrómetro de masas selectivo 5973 INERT., mediante las condiciones de análisis (Tabla 4) para verificar su pureza.

Tabla 4. Condiciones para Cromatógrafo de gases acoplado a masas.

Columna	HP-5ms (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness).
Gas acarreador:	Helio a un flujo de 0.5 mL/min.
Volumen de inyección	2 µL
Modo de inyección	splitless.
Temperatura del inyector	220 °C.
Temperatura Horno Inicial	35 °C por 9 minutos
Temperatura Horno Rampa 1	35 °C a 150 °C a 3 °C/min por 10 minutos
Temperatura Horno Rampa 2	150 °C a 250 °C a 10 °C/min por 10 minutos
Temperatura Horno Rampa 3	250 °C a 270 °C a 3 °C/min por 10 minutos
Modo de adquisición de datos	Scan
Fuente de ionización	Impacto de electrones
Temperatura de la interfaz	290 °C.
Temperatura de la fuente	230 °C.
Temperatura del cuadropolo	150 °C.

2.2.11 Elucidación estructural del Compuesto Activo Aislado.

2.2.11.1 Espectrometría de Masas.

Se inyectó el Compuesto CSG4-F2, Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N acoplado a un espectrómetro de masas selectivo 5973 INERT, se utilizaron las condiciones de análisis de la sección 2.1.10 (Tabla 4) para obtener su peso molecular.

2.2.11.2 Espectroscopía Ultra Violeta – Visible (UV-Vis).

Se analizó CSG4-F2 a una concentración de 10 µg/mL disuelto con metanol, mediante espectrómetro Beckman DU 7500 en un rango de 230 a 600 nm, se determinaron los máximos de absorción y se calculó la absorptividad con la fórmula de Lambert-Beer.

$$\text{Abs} = (\epsilon) (b) (c) \qquad \epsilon = \text{Abs} / (b) (c)$$

Abs = Absorbancia

ϵ = Absortividad molar ($\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$)

b = Ancho de la celda (cm)

c = Concentración de la solución (M)

2.2.11.3 Espectroscopía de Infrarrojo (IR).

Se analizó compuesto aislado CSG4-F2, mediante el espectrómetro IR/ATR Perkin Elmer Modelo Spectrum 100.

2.2.11.4 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Se disolvieron 20 mg de CSG4-F2 en metanol-*d*₄, se utilizó una sonda multinuclear de 5mm de detección directa, y un espectrómetro de RMN Bruker DPX400. Se realizaron los experimentos de RMN de hidrógeno (¹H-RMN), carbono (¹³C-RMN), DEPT-135, DEPT-90, espectros de doble dimensión (2D) HMQC, HMBC y NOESY.

2.2.11.5 Actividad Óptica.

Se utilizó el polarímetro Perkin Elmer Modelo 341 para determinar la rotación óptica del compuesto aislado CSG4-F2. Se pesaron 14 mg de la muestra, se disolvió en 1.4 mL de cloroformo. La muestra se introdujo en celda de 1mL se realizó la lectura a 589 nm a 21°C.

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1 Colecta de Plantas.

Las plantas fueron procesadas como se describió en la sección 2.2.1 de tal manera que se asegurara en lo posible la integridad de las muestras. Se enviaron muestras de cada espécimen al herbario Institucional de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, en la tabla 5 se muestran el número de voucher de cada especie.

Tabla 5. Datos de la recolección y autenticación de las plantas.

Nombre común	Nombre científico	Lugar de colecta	Fecha de colecta	No. voucher
Sangre de drago	<i>Jatropha dioica</i>	Villaldama, NL	Junio 2004	UAN-24077
Salvia azul	<i>Salvia texana</i> ¹	Escobedo, NL	Diciembre 2004	UAN-22298
Salvia azul	<i>Salvia texana</i> ²	Escobedo, NL	Octubre 2005	UAN-22298
Arbusto de salvia azul	<i>Salvia ballotaeflora</i> ²	Villaldama, NL	Mayo 2004	UAN-15925
Arbusto de salvia azul	<i>Salvia ballotaeflora</i> ²	Villaldama, NL	Noviembre 2004	UAN-15925

3.2 Obtención de Extractos Hidroalcohólicos.

La extracción hidroalcohólica de raíz de *J. dioica* y parte aérea de *S. texana* y *S. ballotaeflora* se realizó como se describe en la sección 2.2.2. Los porcentajes de recuperación de los extractos se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Porcentajes de recuperación de extractos hidroalcohólicos de *J. dioica*, *S. texana* y *S. ballotaeflora*.

Nombre científico	Parte de la planta extraída	Peso del extracto	Porcentaje de recuperación
<i>Jatropha dioica</i>	Raíz	540.83 g	7.39 %
<i>Salvia texana</i> ¹	Parte aérea	132.42 g	13.60 %
<i>Salvia texana</i> ²	Parte aérea	154.98 g	12.18 %
<i>Salvia ballotaeflora</i> ¹	Parte aérea	231.66 g	14.07 %
<i>Salvia ballotaeflora</i> ²	Parte aérea	191.78 g	13.47 %

3.3 Evaluación de la Actividad Citotóxica (TC₅₀) de Extractos Hidroalcohólicos de

J. dioica *S. texana* y *S. ballotaeflora*.

Se determinó la TC₅₀ en células Vero de los extractos hidroalcohólicos de las diferentes plantas incluidas en este trabajo como se describió en la sección 2.2.5, las curvas dosis respuesta se observan en la figura 5 y las TC₅₀ se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Valores de TC₅₀ para los extractos hidroalcohólicos de *J. dioica* *S. texana* y *S. ballotaeflora*.

Nombre científico	TC ₅₀ (± D.E.)
<i>J. dioica</i>	644.16 µg/mL (51.57)
<i>S. texana</i> ¹	< 125 µg/mL
<i>S. texana</i> ²	< 250 µg/mL
<i>S. ballotaeflora</i> ¹	< 125 µg/mL
<i>S. ballotaeflora</i> ²	< 125 µg/mL

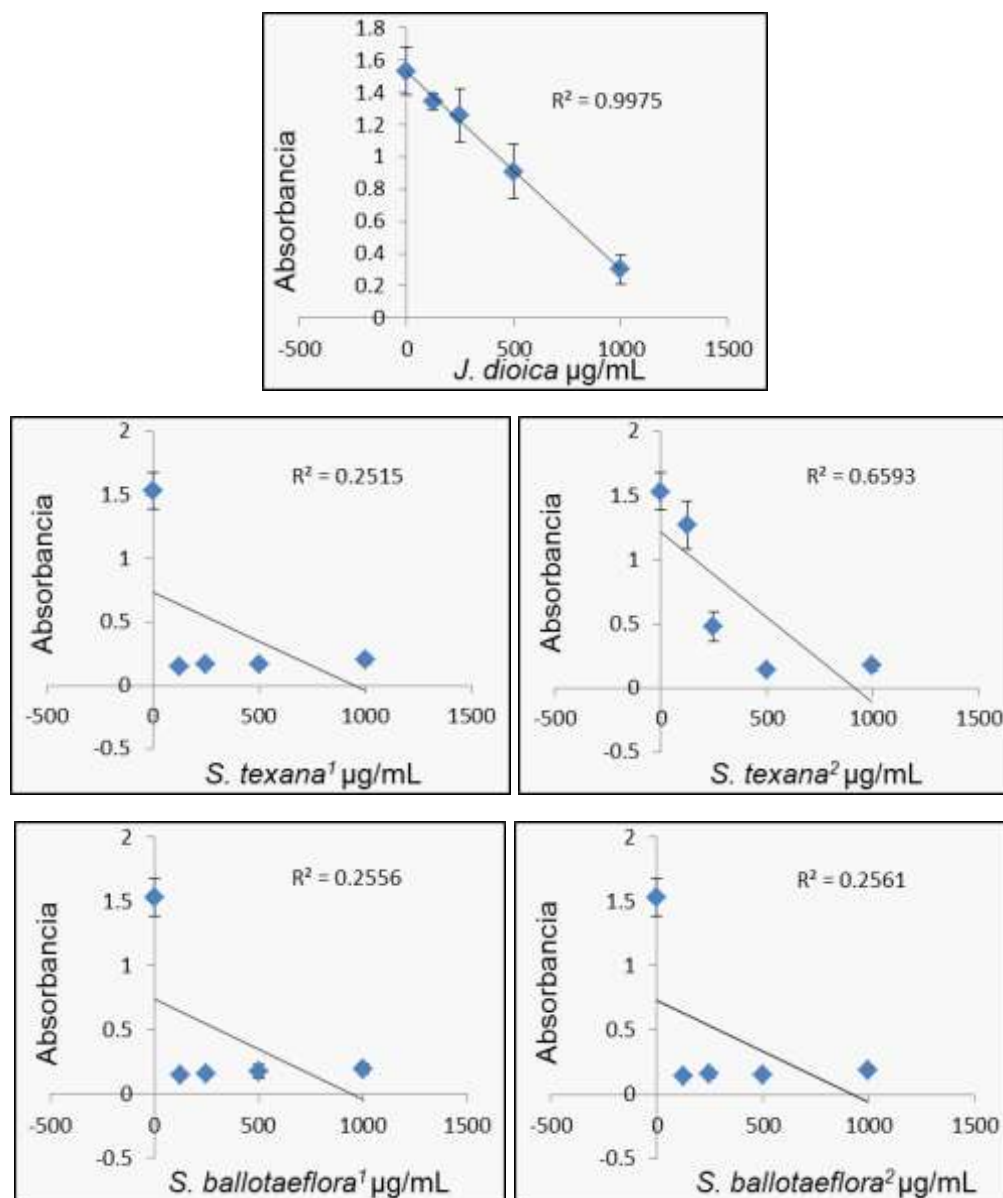


Figura 5. Curvas Dosis Respuesta de Extractos Hidroalcohólicos de *J. dioica* *S. texana* y *S. ballotaeflora*.

3.4 Determinación del Título Viral de VHS-1 y VHS-2.

Se determinó la concentración de UFP/mL en el concentrado viral de VHS-1 y VHS-2 como se describió en la sección 2.2.6. En la tabla 8 se muestra el número de tubo/pozo

y la dilución con el que se obtuvo la cantidad inmediata superior a 100 UFP (“tubo título”) para el ensayo de VHS-1 y VHS-2 respectivamente.

Se determinó la concentración de UFP/mL del concentrado viral utilizando los valores de la tabla 8 de la siguiente manera:

Cálculos para concentrado de VHS-1:

$$322 \text{ UFP}/0.0001 = 3.22 \times 10^6 \text{ UFP/mL del stock viral}$$

Cálculos para concentrado de VHS-2:

$$185 \text{ UFP}/0.00001 = 18.5 \times 10^6 \text{ UFP/mL del stock viral}$$

Se calculó como se describió en la sección 2.2.6 el volumen necesario del tubo 4 y 5, para obtener 100 UFP de VHS-1 y VHS-2 respectivamente de la siguiente manera:

Cálculos para VHS-1:

$$100 \text{ UFP}/322 \text{ UFP} = 0.32 \text{ mL del tubo 4 (dilución } 1:1 \times 10^4)$$

Cálculos para VHS-2:

$$100 \text{ UFP}/185 \text{ UFP} = 0.54 \text{ mL del tubo 5 (dilución } 1:1 \times 10^5)$$

Tabla 8. UFP contadas de cada tubo utilizado en el ensayo de reducción de placas.

No de tubo/pozo	Dilución	Factor de dilución (FD)	UFP contadas de VHS-1	UFP contadas de VHS-2
1	1:1x10 ¹	.1	Incontables	Incontables
2	1:1x10 ²	.01	Incontables	Incontables
3	1:1x10 ³	.001	Incontables	Incontables
4	1:1x10⁴	.0001	322	Incontables
5	1:1x10⁵	.00001	28	185
6	1:1x10 ⁶	.000001	3	16
7	1:1x10 ⁷	.0000001	0	1
8	1:1x10 ⁸	.00000001	0	0
9	1:1x10 ⁹	.000000001	0	0
10	1:1x10 ¹⁰	.0000000001	0	0

3.5 Evaluación de la Actividad Antiherpética (IC₅₀) de Extracto

Hidroalcohólico de *J. dioica*.

Se determinó la IC₅₀ del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* contra VHS-1 y VHS-2 como se describió en la sección 2.2.7.1.1 (Figura 6), en la tabla 9 se observan los resultados obtenidos.

Tabla 9. Determinación de la IC₅₀ del extracto hidroalcohólico de *J. dioica*.

IC ₅₀ del extracto hidroalcohólico de <i>J. dioica</i>		D.E.
VHS-1	283.85 µg/mL	± 12.73
VHS-2	368.11 µg/mL	± 60.45

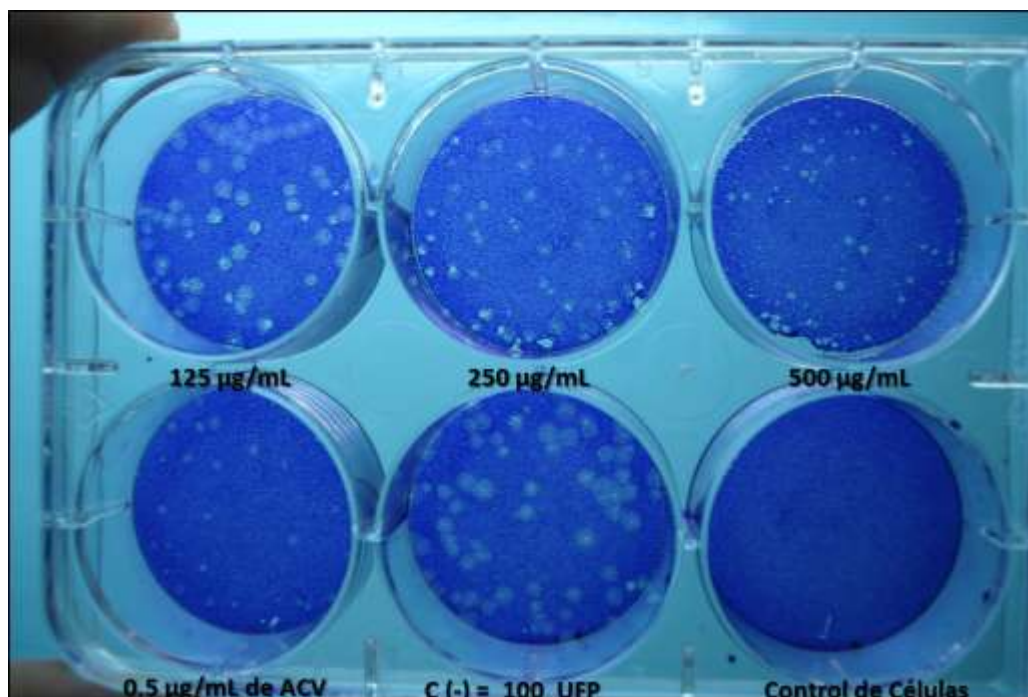


Figura 6. Ensayo de Reducción de Placas del Extracto Hidroalcohólico de *J. dioica* Contra VHS-1.

3.6 Determinación del Índice de Selectividad del Extracto Hidroalcohólico de *J. dioica*.

Se determinó el índice de selectividad (IS) como se describió en la sección 2.2.8. En la tabla 10 se muestra los valores obtenidos del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* para VHS-1 y VHS-2.

Tabla 10. Determinación del índice de selectividad del extracto hidroalcohólico de *J. dioica*.

	IS VHS-1	IS VHS-2
Extracto Hidroalcohólico	2.26	1.74

3.7 Fraccionamiento Biodirigido de Extracto Hidroalcohólico de *J. dioica*.

3.7.1 Obtención de extractos diferenciales del extracto hidroalcohólico de *J. dioica*, evaluación de citotoxicidad, de actividad antiherpética y determinación de IS.

Se realizó la extracción diferencial como se describió en la sección 2.2.9.1, se obtuvieron los extractos de hexano, acetato de etilo, butanol y un residuo acuoso, se determinó su porcentaje de recuperación como se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Extractos, pesos y porcentajes de recuperación obtenidos de la extracción diferencial de extracto hidroalcohólico de *J. dioica*.

Nombre de Extracto Diferencial	Peso extracto obtenido	Porcentaje de Recuperación
Residuo Acuoso	18.4275 g	48.49 %
Butanol	5.0046 g	13.17 %
Acetato de Etilo	7.0720 g	18.61 %
Hexano	3.1518 g	8.29 %

Se determinó la actividad citotóxica de los extractos diferenciales de hexano, acetato de etilo, butanol y residuo acuoso, obtenidos. Las curvas dosis respuesta se observan en la figura 7 y las TC₅₀ se muestran en la tabla 12.

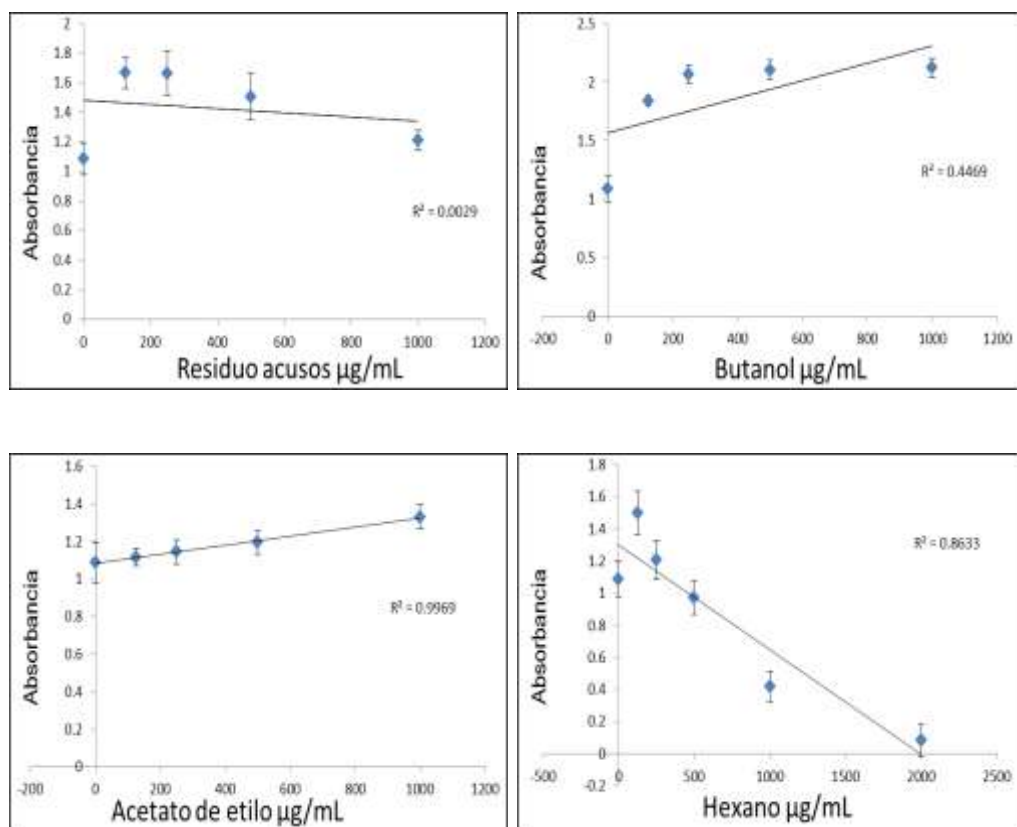


Figura 7. Curvas Dosis Respuesta de Extractos de Hexano, Acetato de Etilo, Butanol y Residuo Acuoso de *J. dioica*.

Tabla 12 Determinación de TC_{50} de extractos diferenciales de *J. dioica*.

Extracto diferencial	TC_{50}	$\pm D. E.$
Residuo Acuoso	>1000 µg/mL	No determinada
Butanol	>1000 µg/mL	No determinada
Acetato de Etilo	>1000 µg/mL	No determinada
Hexano	882.04 µg/mL	± 89.75

Se determinó la actividad antiherpética de los extractos diferenciales de hexano, acetato de etilo, butanol y residuo acuoso, como se describió en la secciones 2.2.7.1.1 y 2.2.7.2. En la tabla 13 se pueden observar las IC_{50} y el porcentaje de reducción de UFP a 250 µg/mL para cada uno de los extractos.

Tabla 13. Determinación de la actividad antiherpética de extractos diferenciales de *J. dioica*.

Extracto Diferencial	IC₅₀ (±D.E.) VHS-1 µg/mL	Porcentaje de reducción de UFP a 250 µg/mL VHS-1	IC₅₀ (±D.E.) VHS-2 µg/mL	Porcentaje de Reducción de UFP a 250 µg/mL VHS-2
Residuo Acuoso	183.24 (±18.61)	68 %	186.96 (±60.45)	67 %
Butanol	402.34 (±80.93)	31 %	424.82 (±54.38)	29 %
Acetato de Etilo	902.74 (±65.07)	13 %	400.86 (±75.36)	31 %
Hexano	300.34 (±24.29)	41 %	267.22 (±30.22)	47 %
Control ACV (+)	1.08 (±0.41)	100 %	0.69 (±0.11)	100 %
Control (-)	---	0 %	---	0 %

Se determinó el índice de selectividad como se describe en 2.2.8. En la tabla 14 se muestra los valores obtenidos del extracto diferenciales de *J. dioica* contra VHS-1 y VHS-2.

Tabla 14. Determinación del índice de selectividad de extractos diferenciales de *J. dioica*.

	Índice de selectividad VHS-1	Índice de selectividad VHS-2
Residuo acuoso	5.45	5.34
Butanol	2.48	2.35
Acetato de etilo	1.10	2.49
Hexano	3.32	3.74

3.7.2 Fraccionamiento Biodirigido del Residuo Acuoso.

El residuo acuoso se sometió a separación cromatográfica a través de una columna lobar como se describió en la sección 2.2.9.2.2. Se obtuvieron cuatro fracciones denominadas CLFR29-F1, CLFR29-F2, CLFR29-F3, y CLFR29-F4. En la tabla 15 se observan los porcentajes de recuperación de las fracciones obtenidas de la columna CLFR29. En las figuras 8 y 9 se observan los cromatogramas del análisis de cromatografía en capa fina y CLAR analítico (Condiciones en las secciones 2.2.9.2.3 y 2.2.9.2.4 respectivamente), de cada una de las fracciones obtenidas.

Tabla 15. Porcentajes de recuperación de fracciones obtenidas de la columna CLFR29.

Fracción	Peso fracción obtenida	Porcentaje de Recuperación
CLFR29-F1	114.10 mg	57.06%
CLFR29-F2	32.00 mg	16.02%
CLFR29-F3	16.30 mg	8.19%
CLFR29-F4	38.10 mg	19.05%

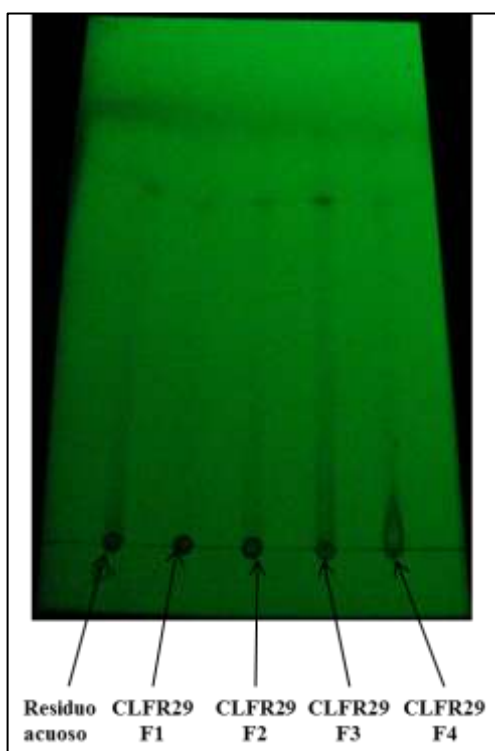


Figura 8. Cromatografía de Capa Fina de Residuo Acuoso y Fracciones de Columna CLFR29.

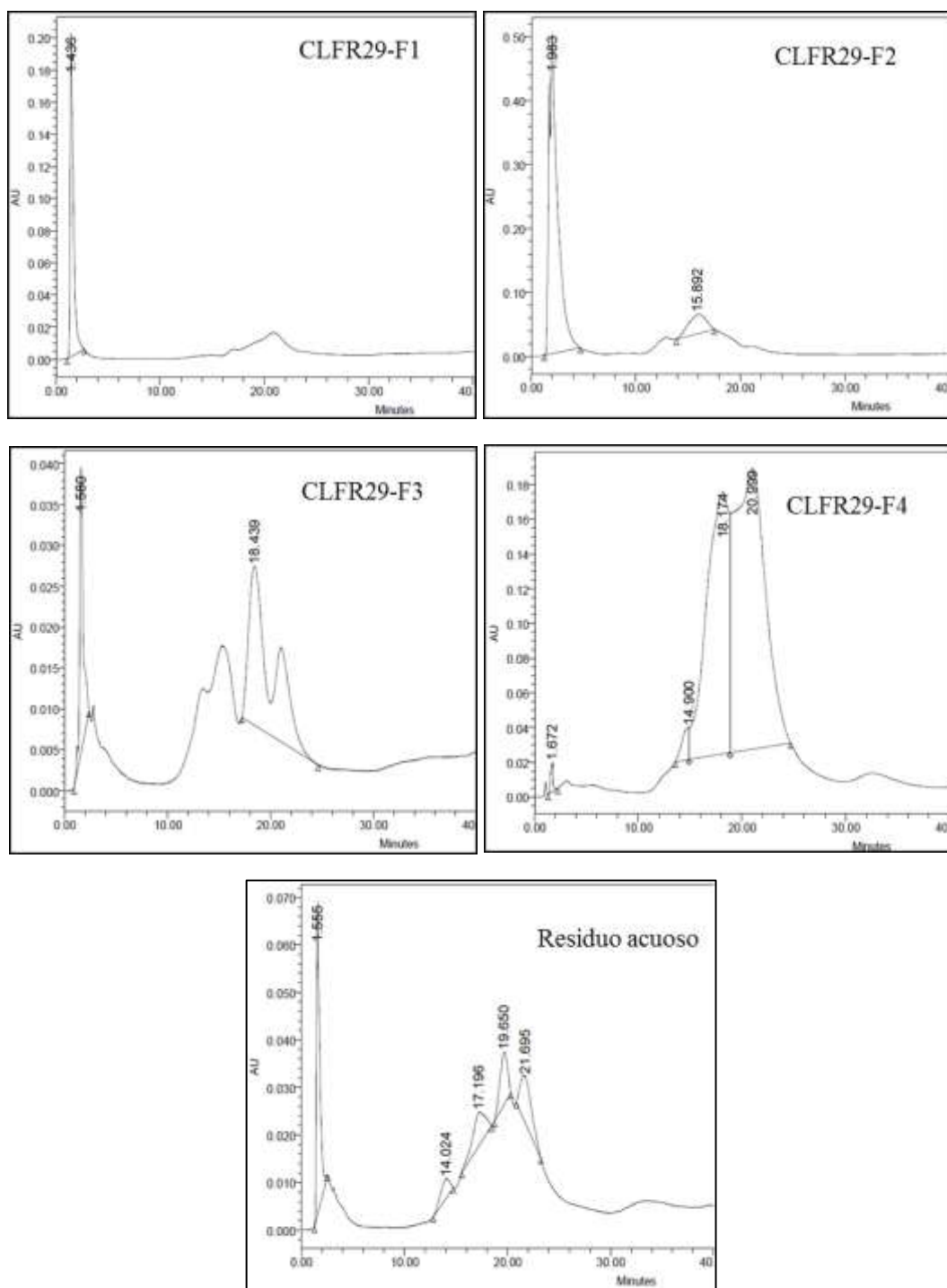


Figura 9. Cromatogramas de CLAR de Residuo Acuoso y Fracciones de Columna CLFR29.

Se determinó la actividad antiherpética como se describe en 2.2.7.2. En la tabla 16 se muestran los resultados en porcentaje de reducción de placas a 250 µg/mL.

Tabla 16. Determinación de actividad antiherpética de fracciones obtenidas de la columna CLFR29.

Fracción	Porcentaje de reducción de UFP a 250 µg/mL VHS-1
CLFR29-F1	0 %
CLFR29-F2	99 %
CLFR29-F3	86 %
CLFR29-F4	100 %

3.7.3 Fraccionamiento Biodirigido del Extracto Hexánico.

El extracto diferencial de hexano se sometió a separación cromatográfica a través de una columna de sílica gel como se describió en la sección 2.2.9.3.2. Se obtuvieron cuatro fracciones denominadas CSG4-F1, CSG4-F2, CSG4-F3, y CSG4-F4. En la tabla 17 se observan los porcentajes de recuperación de las fracciones obtenidas de la columna CSG4. En las figuras 10 y 11 se observan los cromatogramas del análisis de cromatografía en capa fina y CLAR analítico (Condiciones en las secciones 2.2.9.2.3 y 2.2.9.2.4 respectivamente), de cada una de las fracciones obtenidas.

Tabla 17. Porcentajes de recuperación de fracciones obtenidas de la columna CSG4.

Fracción	Peso fracción obtenida	Porcentaje de Recuperación
CSG4-F1	56.0 mg	5.6 %
CSG4-F2	328.0 mg	32.8 %
CSG4-F3	43.8 mg	4.3 %
CSG4-F4	14.7 mg	1.4 %

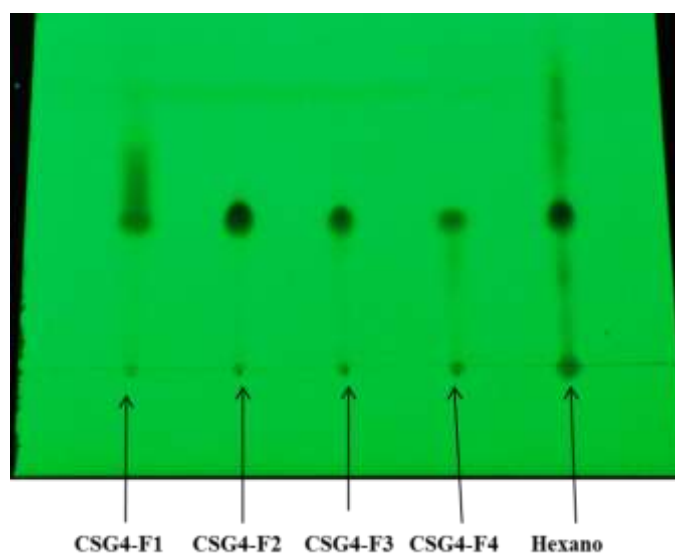


Figura 10. Cromatografía de Capa Fina de Extracto de Hexano y Fracciones de Columna CSG4.

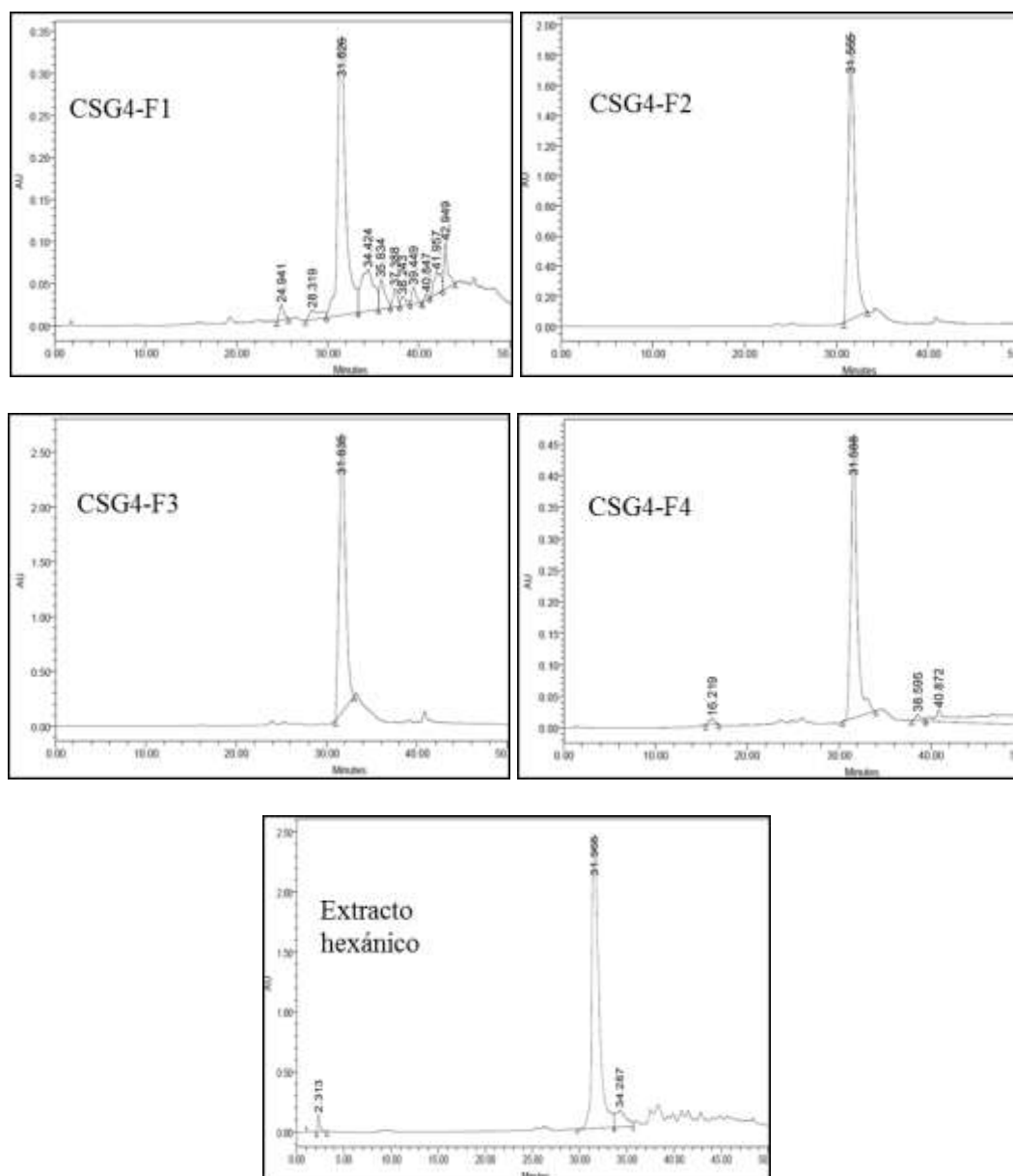


Figura 11. Cromatogramas de CLAR de Extracto de Hexano y Fracciones de Columna CSG4.

Se determinó la actividad antiherpética como se describió en la sección 2.2.7.2. En la tabla 18 se muestran los resultados en porcentaje de reducción de placas a 250 µg/mL.

Tabla 18. Determinación de actividad antiherpética de fracciones de columna CSG4.

Fracción	Porcentaje de reducción de UFP a 250 µg/mL VHS-1
CSG4-F1	5 %
CSG4-F2	28 %
CSG4-F3	24 %
CSG4-F4	11 %

3.8 Análisis de Pureza.

Se realizó análisis de pureza del compuesto aislado CSG4-F2 como se describió en la sección 2.2.10, no se observó ninguna impureza. Se presentan tres espectros (Figura 12b) de UV-Visible, obtenidos de tres puntos diferentes del pico en el cromatograma de CLAR (Figura 12a), son semejantes lo cual confirma la pureza. En la figura 12c se observa el cromatograma de gases (condiciones en la tabla 4) del compuesto CSG4-F2.

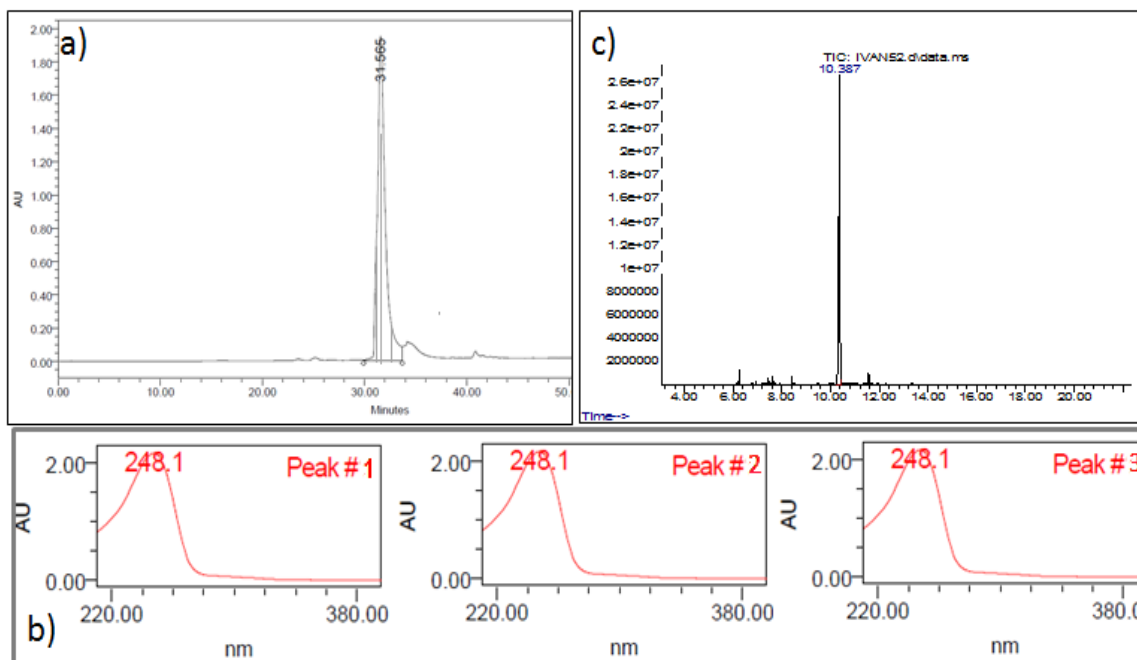


Figura 12. a) Cromatograma CLAR de Fracción CSG4-F2. b) Espectros de UV-Visible de Tres Puntos de Pico de CSG4-F2. c) Cromatograma de Gases de CSG4-F2.

3.9 Análisis Espectroscópico

3.9.1 Espectroscopia de Masas.

Se obtuvo el espectro de masas como se describió en la sección 2.2.11.1. En la figura 15 (Apéndice A) se observa el espectro del compuesto aislado CSG4-F2. Se observaron las siguientes señales principales: 314.2 [M^+] (21%), 149.1 (100%), 176.1 (57%) y 167.1 (83%) m/z .

3.9.2 Espectroscopia UV-Vis.

Se obtuvo el espectro UV-Visible como se describió en la sección 2.2.11.2. En la figura 16 (Apéndice A) se observa el espectro del compuesto aislado CSG4-F2 con un máximo a 248 nm con ϵ de $16,000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

3.9.3 Espectroscopia de IR.

Se obtuvo el espectro de IR como se describió en la sección 2.2.11.3. Se observaron bandas de importancia a frecuencias de 2955, 2929, 2872, 1688, 1625 cm^{-1} . En la figura 17 (Apéndice A) se observa el espectro del compuesto aislado CSG4-F2.

3.9.4 Espectroscopia de RMN.

Se obtuvo el espectro de ^1H -RMN; (400 MHz, CDCl_3): 3.13 (1H, s, CH-7), 2.89 (2H, d, $J = 4.47$, CH_2 -13), 2.80-2.71 (1H, m, CH-2), 2.52-2.27 (4H, m, CH_2 -1, CH-6, H-3), 1.96 (1H, dt, $J = 15.9, 6.4, 2.6$, H-3), 1.89 (1H, d, $J = 7.7$, CH-11), 1.62 (1H, dt, $J = 7.4, 4.6$, CH-12), 1.23 (3H, s, CH_3 -15), 1.16 (3H, d, $J = 7.4$, CH_3 -6), 1.15 (3H, d, $J = 6.8$, CH_3 -2), 1.08 (3H, d, $J = 7.4$, CH_3 -9), 0.85 (3H, s, CH_3 -15). Se obtuvo el espectro de ^{13}C -RMN; (100 MHz, CDCl_3): 12.4 (CH_3), 16.7 (CH_3), 17.6 (CH_3), 21.5 (CH_3), 22.7 (CH),

26.2 (C), 28.3 (CH₃), 32.5 (CH₂), 33.1 (CH), 35.8 (CH₂), 38.0 (CH), 40.4 (CH₂), 47.9 (CH), 52.5 (CH), 65.5 (C), 149.6 (C), 181.5 (C), 203.6 (CO), 206.9 (CO), 207.2 (CO). Así mismo se obtuvieron los espectros de los experimentos DEPT90, DEPT 135 y espectros de doble dimensión COSY, HMQC y HMBC como se describió en la sección 2.2.11.4. En las figura 18- 35 (Apéndice A) se observan los espectros del compuesto aislado CSG4-F2.

3.10 Actividad Óptica.

Se determinó la actividad rotacional como se describió en la sección 2.2.11.5, se obtuvo un valor de $[\alpha]_{21}$: +160 del compuesto aislado CSG4-F2.

3.11 Evaluación de Actividad Citotóxica (TC₅₀) del Compuesto Aislado CSG-F2.

Se determinó la actividad citotóxica como se describió en la sección 2.2.5. En la tabla 19 se muestra la TC₅₀ obtenida del compuesto aislado CSG4-F2.

Tabla19. Determinación de la actividad citotóxica del compuesto aislado CSG4-F2.

TC₅₀ del compuesto aislado CSG4-F2	± D. E.
2,237.15 µg/mL	± 148

3.12 Evaluación de Actividad Antiherpética (IC₅₀) del Compuesto Aislado CSG-F2.

Se determinó la actividad antiherpética como se describió en la sección 2.2.7.1.1. En la tabla 20 se muestra la IC₅₀ obtenida del compuesto aislado CSG4-F2.

Tabla 20. Determinación de la actividad antiherpética del compuesto aislado CSG4-F2.

IC₅₀ del compuesto aislado Rioloatriona		± D. E.
VHS-1	451. 72 µg/mL	± 55.9
VHS-2	450.79 µg/mL	± 40.4

3.13 Determinación del Índice de Selectividad del Compuesto Aislado CSG-F2.

Se determinó el índice de selectividad como se describió en la sección 2.2.8. En la tabla 21 se muestra los valores obtenidos del compuesto aislado CSG4-F2 para VHS-1 y VHS-2.

Tabla 21. Determinación del índice de selectividad del compuesto aislado CSG4-F2.

	Índice de selectividad VHS-1	Índice de selectividad VHS-2
CSG4-F2	4.95	4.96

CAPITULO 4

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se seleccionaron tres plantas de la región noreste de México, las cuales cuentan con antecedentes etnofarmacológicos y criterios quimiotaxonómicos que sugieren la presencia de compuestos con actividad antiherpética. Estas especies fueron *J. dioica*, *S. ballotaeflora* y *S. texana*.

J. dioica es una Euphorbiaceae cuya raíz según antecedentes etnofarmacológicos, es usada para el tratamiento de úlceras labiales provocadas en su mayoría por el VHS-1, además; también se cuenta con reportes que muestran a las especies del genero *Jatropha* como candidatas para el aislamiento de compuestos con actividad antiherpética (54 y 56).

S. ballotaeflora es un arbusto de las Lamiaceae que no presenta reportes de actividad biológica, esto es debido entre otras cosas, a la pequeña área geográfica en la que se puede encontrar, la misma situación ocurre en el caso de *S. texana*; sin embargo, la familia y el género al que pertenecen estas especies son ampliamente conocidas por su gran variedad de actividades biológicas (38, 63, 64 y 65).

Una vez elegida las plantas, es necesario seleccionar el tipo de disolventes que se necesitaran para la extracción primaria. Pérez-López reportó en el 2007 que los disolventes hidroalcohólicos presentan la mejor opción para una mayor actividad biológica y una mayor recuperación de compuestos (78). En este estudio se llevaron a cabo las extracciones hidroalcohólicas de las plantas mediante el uso de una mezcla de metanol/agua (90:10) como disolvente de extracción para los extractos primarios, debido a la intención de obtener la mayor cantidad de compuestos y a la disponibilidad de los disolventes presentes en nuestro laboratorio.

En una investigación de actividad antifúngica en el departamento de química analítica, realizada por Alanís en el 2007, se colectaron especímenes de *S. ballotaeflora*, *S. texana* y *J. dioica* entre mayo 2004 y octubre 2005, el excedente seco de las plantas fue guardado en frascos para futuras investigaciones de actividad biológica. Para la determinación de actividad citotóxica y antiherpética de la presente tesis se utilizaron los especímenes colectadas por Alanís. Debido a que se realizó una primera colecta de *S. ballotaeflora* en Mayo de 2004 y una segunda colecta en Diciembre de 2004, se decidió hacer las

extracciones de cada colecta por separado, esto con el fin de evitar la incertidumbre en la determinación de la actividad biológica de cada una de las colectas, ya que la variación de temporada y lugar de la colecta, provoca la variación en la actividad biológica en una misma especie (63), en el caso de las dos colectas de *S. texana* (Diciembre de 2004 y Octubre de 2005), se prosiguió de la misma manera. Obteniéndose con lo anterior los extractos hidroalcohólicos de *S. ballotaeflora*¹, *S. ballotaeflora*², *S. texana*¹, *S. texana*² y *J. dioica* (tabla 5).

Una vez obtenidos y preparados los extractos hidroalcohólicos (Secciones 3.1 y 3.2), se evaluó la actividad citotóxica mediante la determinación de la TC₅₀ de los cinco extractos hidroalcohólicos en células Vero (Sección 3.3). En el caso de las curvas dosis respuesta obtenidas de los extractos hidroalcohólicos de *S. ballotaeflora*¹, *S. ballotaeflora*², y *S. texana*¹ (Figura 5), se observó una baja correlación debido a que todas las concentraciones utilizadas para esta determinación, presentaban una citotoxicidad mayor a la TC₅₀, lo cual nos indicó que dicha TC₅₀ se encuentra por debajo de 125 µg/mL. En el caso de la curva dosis respuesta de *S. texana*², se observó que la TC₅₀ esta por debajo de 250 µg/mL, por lo que con las concentración utilizadas no se pudo determinar con exactitud su respectiva TC₅₀ (Figura 5). Por ultimo *J. dioica* presentó la menor citotoxicidad con un valor de TC₅₀ de 644 µg/mL. A pesar que en el caso de *S. ballotaeflora*¹, *S. ballotaeflora*², *S. texana*¹ y *S. texana*² no se determinó la TC₅₀ la información obtenida es suficiente para concluir que *J. dioica* presentó la menor citotoxicidad (Tabla 7). Debido a lo anterior, se seleccionó el extracto de raíz de *J. dioica* para someterlo a evaluación de la actividad antiherpética,

mediante ensayo de reducción de placa, el cual se lleva a cabo en células Vero, de ahí la importancia de seleccionar un extracto con la menor citotoxicidad posible.

Para la determinación de la actividad antiherpética, es importante comparar la disminución en la formación de UFP contra un control negativo de disminución. Se procuró que la formación de UFP del control negativo sea lo más cercano a 100 UFP, el cual indica el 0% en la disminución de formación de UFP. Mediante la determinación del título viral (Sección 3.4), se pudo establecer la concentración en UFP/mL del concentrado viral de VHS-1 y VHS-2 (3.22×10^6 y 18.5×10^6 UFP/mL respectivamente), esto es importante para calcular el volumen del “tubo título” que se necesitó para inocular todos los pozos con 100 UFP, a excepción del pozo control de células. Se observó que el “tubo título” para VHS-1 y VHS-2 son los tubos 4 y 5 respectivamente. Se calculó el volumen a tomar del “tubo título”, siendo de 0.32 mL del tubo 4 y 0.54 mL del tubo 5 para VHS-1 y VHS-2 respectivamente. Con lo anterior se aseguró la inoculación de 100 UFP en una monocapa de células Vero. El título viral se hizo con el fin de estandarizar todos los ensayos de reducción de placas en este trabajo.

Después de realizar el título viral y calcular el volumen de inóculo para infectar con 100 UFP a las células Vero, se procede a determinar la actividad antiherpética. Se evaluó dicha actividad del extracto hidroalcohólico de *J. dioica* mediante la determinación de la IC_{50} (Sección 3.5). En base a los resultados expuestos en la tabla 9, se observó una actividad

mayor contra VHS-1 que contra VHS-2 con valores de IC_{50} de 283 y 368 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Una vez demostrada la actividad antiherpética del extracto hidroalcohólico de raíz de *J. dioica*, se realizó la extracción diferencial con disolventes de distinta polaridad (Sección 3.7.1), esto con el fin de separar la diversidad de compuesto en base a su polaridad. Se observó que el residuo acuoso tiene un mayor porcentaje de recuperación seguido del extracto de acetato de etilo, butanol y por último del hexano; cabe señalar que el aspecto de los extractos es viscoso de color café oscuro a excepción del extracto de hexano que es de tipo ceroso de color amarillo-claro. Posteriormente, se evaluó la actividad citotóxica de los extractos diferenciales de *J. dioica* mediante la determinación de la TC_{50} . Se observó (figura 7) que las absorbancias de los extractos butanólico, acetato de etilo y residuo acuoso, en las diferentes concentraciones utilizadas (125, 250, 500, y 1,000 $\mu\text{g/mL}$), son mayores en comparación con el control negativo de citotoxicidad, este aumento en la absorbancia indica una ligera actividad proliferativa por parte estos extractos. El extracto hexánico presentó TC_{50} menor que el resto de los extractos (882 $\mu\text{g/mL}$), sin embargo, se considera una baja citotoxicidad. En la tabla 12 se puede observar los valores obtenidos de TC_{50} para los extractos de butanol, acetato de etilo, hexano y residuo acuoso. Se procedió a la evaluación de la actividad antiherpética de los extractos diferenciales obtenidos mediante la determinación de la IC_{50} y porcentaje de reducción de placas a 250 $\mu\text{g/mL}$ (Sección 3.7.1). En base a los datos observados en la tabla 13, se determinó que el residuo acuoso presentó la mayor actividad antiherpética seguido del extracto de hexánico. Ninguno de los extractos diferenciales presentó mayor actividad antiherpética que el ACV. Es importante señalar,

que también se expresó la actividad antiherpética como porcentaje de reducción de UFP a 250 µg/mL, debido a que este parámetro es más sencillo de determinar que la IC₅₀. Durante el resto del aislamiento biodirigido, se determinó únicamente el porcentaje de reducción de UFP a 250 µg/mL, esta medida; con el fin de agilizar los bioensayos y preservar los recursos durante el aislamiento biodirigido. Un componente intrínseco de las pruebas o ensayos antivirales, es la determinación de un índice de selectividad (IS) hacia las células huésped. El IS se refiere a la relación de la máxima concentración de fármaco que causa ya sea el 50 % o el 90% de inhibición del crecimiento de células normales (TC₅₀, TC₉₀) y la concentración mínima a la cual se inhibe el 50% o el 90% del virus (IC₅₀, IC₉₀). Los reportes de actividad antiviral de extractos/compuestos son valores limitados si no se determina el IS, aún con valores muy bajos de IC₅₀. Se determinó el índice de selectividad para el extracto hidroalcohólico de *J. dioica*, así como para cada uno de los extractos diferenciales. El extracto hidroalcohólico presentó un IS de 2.3 y 1.7 para VHS-1 y VHS-2 respectivamente. Con respecto a los extractos diferenciales (Tabla 14) se observó que el residuo acuoso presentó un mayor índice de selectividad para VHS-1 y VHS-2 (5.4), seguido del hexánico, butanólico y por último del de acetato de etilo. Debido al mejor índice de selectividad, el residuo acuoso fue seleccionado en primera instancia para proseguir con el aislamiento biodirigido.

Se continuó con el aislamiento biodirigido del residuo acuoso, para lo cual se hizo una separación cromatográfica mediante CC a baja presión en columna Lobar RP-18. (Sección 3.7.2). Se obtuvieron 4 fracciones principales (Tabla 15) y se observó que la fracción CLFR29-F1 presentó un mayor porcentaje de recuperación seguido de las fracciones

CLFR29-F4, CLFR29-F2 y CLFR29-F3. Posteriormente se realizó un análisis cromatográfico en capa fina y CLAR analítico de las cuatro fracciones obtenidas y del residuo acuoso. En el análisis por capa fina, (Figura 8), no se obtuvo una resolución de las fracciones obtenidas ni del residuo acuoso. Sin embargo; se observó que por CLAR analítico las fracciones CLFR-29-F2, CLFR29-F3 y CLFR29-F4 son cromatográficamente diferentes (Figura 9). En el cromatograma correspondiente a la fracción CLFR29-F1, se observó principalmente un pico cromatográfico, que considerando el tiempo de elución de la columna, indica la presencia de compuesto(s) de características polares. A las fracciones obtenidas se les determinó el porcentaje de reducción de placas a la concentración de 250 µg/mL. En la tabla 16 se pueden observar los resultados de la determinación de la actividad antiherpética de las fracciones CLFR29-F1, CLFR29-F2, CLFR29-F3 y CLFR29-F4, en dicha tabla se observó que la fracción CLFR29-F4, presentó la mayor actividad antiherpética seguido de las fracciones CLFR29-F2 y CLFR29-F3, la fracción CLFR29-F1 no presentó actividad antiherpética. Debido a que la fracción CLFR29-F4 presentó la mayor actividad antiherpética, resultó la principal candidata para proseguir con ella para el aislamiento biodirigido, sin embargo; los 38 mg de la fracción obtenida y el poco residuo acuoso remanente, resultaron ser insuficientes para proseguir con dicho aislamiento.

A causa del bajo rendimiento obtenido de las fracciones del residuo acuoso, se prosiguió con el extracto diferencial hexánico para el aislamiento biodirigido de compuestos con actividad antiherpética, debido a que presentó el segundo mejor índice de selectividad. El extracto diferencial hexánico se sometió a un proceso de separación en cromatografía en columna flash de silica gel. (Sección 3.7.3). Se obtuvieron 4 fracciones principales (Tabla

17) y se observó que la fracción CSG4-F2 presentó un mayor porcentaje de recuperación seguido de las fracciones CSG4-F1, CSG4-F3 y CSG4-F4. Posteriormente, se realizó un análisis cromatográfico en capa fina y CLAR analítico de las cuatro fracciones obtenidas y del extracto diferencial hexánico. En el análisis por CCF (Figura 10) del extracto hexánico, se observa un compuesto mayoritario con un valor de R_f de 0.4, mientras que en el carril de las fracciones CSG4-F1 y CSG4-F4 se observó dicho compuesto mayoritario acompañado de otros compuestos a R_f mayores y menores respectivamente. Por último en el carril de las fracciones CSG4-F2 y CSG4-F3 se observó el compuesto mayoritario con un R_f de 0.4. En el análisis de estas mismas fracciones por CLAR analítico, (Figura 11) se observó que CSG4-F1, CSG4-F2, CSG4-F3 y CSG4-F4 son fracciones cromatográficamente diferentes, estos cromatogramas confirmaron lo observado en capa fina, en las fracciones CSG4-F2 y CSG4-F3 se observó un compuesto mayoritario.

A las fracciones obtenidas de la columna CSG4 se les determinó el porcentaje de reducción de placas a la concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$ (Sección 3.7.3). En la tabla 18 se observó que de las fracciones CSG4-F2 y CSG4-F3 presentaron una mayor actividad antiherpética en comparación del resto de las fracciones, obteniéndose con esto el aislamiento de un compuesto con actividad antiherpética.

Se analizó CSG4-F2 por cromatografía de gases acoplado a masas (Sección 3.8). En el cromatograma de la figura 12 se observa un solo pico a 10.3 minutos, lo cual concuerda con

los resultados obtenidos del análisis de esta fracción por CLAR y CCF, por lo que se puede concluir que la fracción CLFR4-F2 esta constituida de un solo compuesto.

Una vez comprobado el aislamiento de un compuesto con actividad antiherpética se prosiguió a la elucidación de la estructura. Cabe mencionar que todos los espectros obtenidos y sus ampliaciones se encuentran en el material anexo. En la figura 15 se observa el espectro de masas del compuesto denominado CSG4-F2, con un ión molecular de 314 g/mol, basándonos en este dato y en el de otros espectros que más adelante se discuten, se encontró que corresponde a la fórmula molecular de $C_{20}H_{26}O_3$. Con dicha fórmula molecular se pudo calcular el número de insaturaciones que presenta este compuesto y resultó en 8.

Mediante el análisis del espectro UV-Visible del compuesto aislado CSG4-F2 (Figura 16), se observó un valor de ϵ importante, con lo cual se infirió la conjugación de una olefina con electrones no compartidos de un posible carbonilo. La posibilidad de la conjugación de dos dobles enlaces quedó descartada, debido a que en el espectro ^{13}C -RMN se observó solo dos señales de carbonos olefínicos. Con respecto al espectro de IR obtenido (Sección 3.9.3, Figura 17) se confirma la presencia de grupos carbonilo y olefínico, según las bandas a 1688 y 1625 cm^{-1} , que corresponden a estiramientos carbono doble enlace oxígeno y carbono doble enlace carbono respectivamente. Además, se observaron solamente bandas por debajo de 3,000 cm^{-1} , que indican estiramientos de carbono enlazado

a hidrogeno de grupos alifáticos, lo anterior revela la ausencia de hidrógenos enlazado al grupo olefínico.

En el espectro de ^1H -RMN (figuras 18-20) se observaron señales en la zona de alifáticos. Se presentaron cinco señales de metilos que integraron cada una para tres hidrógenos (1.23, 1.16, 1.15, 1.08 y 0.85 ppm), tres singuletes y dos dobletes. Se observan además señales desde 1.6 a 2.8 ppm las cuales integran para uno o dos hidrógenos (2.80-2.71, 2.52-2.27, 1.96, 1.89 y 1.62), dichas señales se observaron en forma de multipletes, lo que indica que estos hidrógenos se están acoplando a otros hidrógenos enlazados a carbonos vecinos. Por último, se observan otras dos señales, un singulete y un doblete, los cuales integran para uno y dos hidrógenos (3.13 y 2.89 ppm) respectivamente. Se hizo el conteo de 26 señales de hidrógenos en total, los cuales concuerdan con la fórmula molecular condensada determinada (Sección 3.9.1).

En el espectro de ^{13}C -RMN (figuras 22-24) se observaron 15 señales en el área de alifáticos (12.4, 16.7, 17.6, 21.5, 22.7, 26.2, 28.3, 32.5, 33.1, 35.8, 38.0, 40.4, 47.9, 52.5 y 65.5 ppm), dos en el área de olefinas (149.6 y 181.5 ppm) y 3 en el área de carbonilos, específicamente cetonas por el valor de desplazamiento químico (203.6, 206.9 y 207.2 ppm), descartándose aldehídos debido a la ausencia de señales por encima de 9 ppm en el espectro de ^1H -RMN. Se hizo un conteo de 20 señales de carbonos en total, los cual concuerda con la fórmula molecular condensada determinada y que corresponde a un diterpeno (Sección 3.9.1). De acuerdo al número de insaturaciones que podemos deducir de

los espectros hasta aquí mencionados, se tiene una insaturación por un doble enlace C-C y 3 insaturaciones por doble enlace C-O de las cetonas. El resto de las insaturaciones fueron asignados a ciclos por lo que se concluyó que el compuesto tiene 4 ciclos.

Mediante el uso de los datos arrojados por los experimentos DEPT 90 y DEPT 135 (figura 25) se determinaron qué señales del espectro ^{13}C -RMN pertenecen a CH_3 (12.4, 16.7, 17.6, 21.5 y 28.3 ppm), CH_2 (32.5, 35.8 y 40.4 ppm) CH (22.7, 33.1, 38.0, 47.9 y 52.5) y C (26.2, 65.5, 149.6, 181.5, 203.6, 206.9 y 207.2 ppm). Posteriormente se llevaron a cabo experimentos de doble dimensión para determinar las conectividades y elucidar la estructura. Primero se hizo la correlación C-H a un enlace mediante el experimento HMQC (Figura 26-28) con la finalidad de saber qué hidrógeno está unido a qué carbono. Con el experimento COSY (Figura 21), se determinaron las correlaciones de hidrógenos vecinos. Por último, se determinaron las correlaciones C-H a larga distancia (2 a 4 enlaces) con el experimento HMBC (Figuras 29-34). El conjunto de todos estos datos espectrales nos llevó a proponer la estructura de la figura 13.

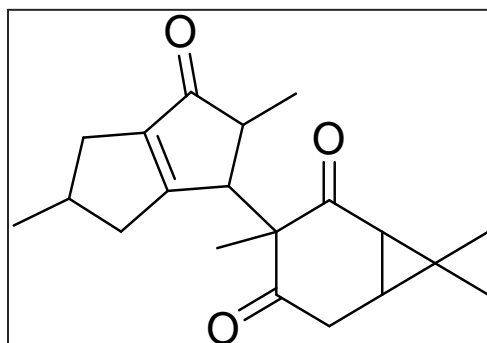


Figura 13. Estructura Propuesta para el Compuesto Aislado CSG4-F2.

Una vez obtenida la estructura planar del compuesto CSG4-F2, se hizo una búsqueda bibliográfica con el fin de saber si este compuesto ya había sido descrito previamente. Se encontró un reporte de 1980 en el que se aisló un compuesto llamado Rioloatriona con el mismo esqueleto estructural (Figura 14). Este compuesto fue aislado por Domínguez y colaboradores a partir del extracto de hexano de *J. dioica* colectada en la cercanía de la carretera Monterrey-Salttillo (62). La estructura tridimensional de la Rioloatriona fue comprobada por medio de difracción de Rayos X.

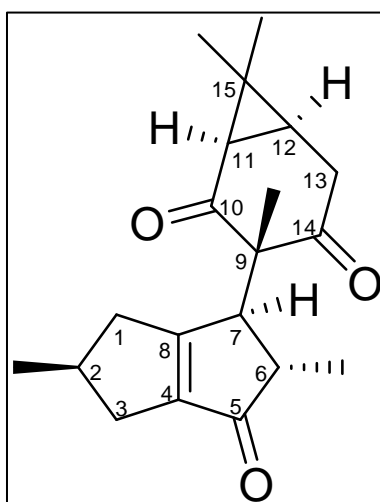


Figura 14. Estructura de compuesto aislado CSG4-F2 (Rioloatriona).

Se cotejaron todos los datos espectroscópicos reportados para la Rioloatriona con los datos espectroscópicos del compuesto CSG4F2 y fueron idénticos. Con el fin de comprobar si la estereoquímica del compuesto CSG4-F2 era la misma que la de la Rioloatriona, se determinó la rotación óptica y se hizo un espectro NOESY (Figura 35). El resultado de

rotación óptica dio prácticamente el mismo valor que para la Rioloatriona, $[\alpha]_{25} = +160$. Mediante el análisis de datos arrojados en el espectro NOESY, se lograron ver los acoplamientos dipolares importantes que justifican la estereoquímica del compuesto. Se observó el acoplamiento dipolar de los hidrógenos 11 y 12, lo que indica que ambos están dispuestos hacia el mismo lado. El acoplamiento de H-7 con el Me-6 y la ausencia de acoplamiento de H-7 con el H-6 lo cual indica que H-7 se encuentra al mismo lado que Me-6. Se observa también el acoplamiento dipolar entre H-2 con H-1 α y H3 α (en la zona de 2.45 a 2.52 ppm), lo cual indica que estos hidrógenos están orientados hacia abajo del plano. Por descarte se deduce que los hidrógenos 1 y 3 β son los que aparecen a 2.33 y 1.96 ppm respectivamente. Aunado a ello, se observa el acoplamiento de H-1 β con Me-2 y Me-9 que están orientados hacia arriba del plano. Con este análisis de la estereoquímica por NOESY, se puede identificar al compuesto CSG4-F2 como Rioloatriona, previamente aislado de *J. dioica* por Domínguez y colaboradores en 1980.

Con respecto a la actividad biológica del compuesto aislado, Rioloatriona, se hizo la evaluación de la citotoxicidad, de la actividad antiherpética y se calculó el índice de selectividad. Se determinó la TC₅₀ de la Rioloatriona (2,237.15 $\mu\text{g/mL}$), se observó un bajo grado de citotoxicidad, comparado con los valores obtenidos para el extracto hidroalcohólico (644.16 $\mu\text{g/mL}$) y el extracto diferencial hexánico (882 $\mu\text{g/mL}$), de donde proviene la rioloatriona

Se determinó la IC_{50} de la Rioloatriona contra VHS-1 y VHS-2 (451y 450 μ g/mL) observándose una disminución de la actividad antiviral, comparando con el extracto hidroalcohólico (283 y 368 μ g/mL) así como del extracto diferencial hexánico (300 y 267 μ g/mL), de donde proviene la rioloatriona.

El índice de selectividad se calculó como el cociente entre los valores de TC_{50} e IC_{50} , el cual se utilizó como un criterio para considerar la efectividad antiviral de los extractos y del compuesto aislado. El índice de selectividad de la rioloatriona fue determinado (4.95 y 4.96). Se observó una mejora en el índice de selectividad en comparación de el extracto hidroalcohólico (2.26 y 1.47) y el extracto diferencial hexánico (3.32 y 3.74), de donde proviene la rioloatriona.

En resumen se logró obtener un compuesto con moderada actividad antiviral contra VHS-1 y VHS-2, a partir del extracto hidroalcohólico de la planta *J. dioica*. La actividad antiherpética determinada de las fracciones hidroalcohólica, hexánica y sobre todo en el residuo acuoso, justifica el uso tradicional de esta especie en el noreste de México, en casos donde se observan úlceras y vesículas en mucosa bucal. Esto deja patente que la selección de productos naturales bajo el criterio etnofarmacológico, es de suma importancia para incrementar la probabilidad de encontrar nuevos fármacos con la actividad buscada.

Por otro lado, el compuesto aislado Rioloatriona, es el único diterpeno reportado con el esqueleto de tipo Riolozano, por lo que será de interés ahondar en estudios encaminados a elucidar la ruta biosintética del mismo y determinar su posible precursor. Debido a lo anterior, se considera importante el continuar con mayor profundidad, la investigación de este y otros compuestos que resulten con actividad antiherpética presentes en esta planta.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones

- Se evaluó la toxicidad sobre células Vero de los extractos hidroalcohólicos de las plantas *S. texana*, *S. ballotaeflora* y *J. dioica* y se determinó que solo la planta *J. dioica*, no mostró citotoxicidad importante a las dosis probadas con una valor de $TC_{50} = 650 \mu\text{g/mL}$.
- Se evaluó la actividad *in vitro* contra VHS-1 y VHS-2 del extracto Hidroalcohólico de *J. dioica* y presentó valores de IC_{50} de 283 y 368 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

- Se determinó la actividad antiherpética *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *J. dioica*, de acuerdo a su índice de selectividad calculado, con un valor de 2.3 y 1.74 para VHS-1 y VHS-2 respectivamente.
- Se aisló un diterpeno a partir del extracto deferencial de Hexano y se caracterizó e identificó como Rioloatriona, el cual ya había sido obtenido de la raíz de *J. dioica* previamente por Domínguez y colaboradores en 1980 y reportado por su actividad contra *S. aureus*.
- Se determinó la citotoxicidad de la Rioloatriona con un valor de TC_{50} de 2,237 $\mu\text{g/mL}$ y la actividad contra VHS-1 y VHS-2 *in vitro* con valores de IC_{50} de 451 y 450 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.
- Se concluye que la actividad antiherpética *in vitro* del compuesto aislado, Rioloatriona, es moderada en base al valor del índice de selectividad calculado, el cual fue de 4.9 para ambos virus.

5.2 Perspectivas

- En base a que la estructura de la Rioloatriona es única, es decir, no existen otros compuestos del mismo tipo estructural de Riolozano, será importante hacer estudios encaminados a determinar la ruta biosintética de la Rioloatriona.
- Continuar con los estudios de aislamiento biodirigido de compuestos antiherpéticos a partir de las fracciones acuosa y butanólica.
- Debido a que el virus del Herpes Simplex desarrolla una infección de latencia, es importante determinar si los extractos o el compuesto aislado obtenidos de *J. dioica* con actividad antiherpética, presentan algún efecto en el establecimiento de la infección en una línea neuronal (SN-H-SN).
- En aras de llevar a cabo un estudio de relación estructura-actividad, y con la finalidad de mejorar la actividad antiviral, será de interés hacer la síntesis de derivados a partir del compuesto aislado y evaluación de la actividad citotóxica y antiviral de éstos en el modelo *in vitro* establecido.
- Evaluar la actividad del extracto, fracciones y compuesto aislado de *J. dioica* contra otros virus y otros microorganismos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferrándiz C. Dermatología Clínica. Elsevier España. (2001). 2, 45-46.
2. Roizman B, Knipe DM, Whitely RJ. Herpes simplex virus. In "Fields virology" (D. M. Knipe, and P. M. Howley, Eds.) Lippincott, Williams and Wilkins Philadelphia. (2007). 2501-2602.
3. Miller CH. Control de la infección y manejo de materiales peligrosos para el equipo de profesionales de la salud dental. Elsevier España. (2000). 70-73.
4. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Patología Estructural y Funcional. Elsevier España. (2005). 7, 369-371.
5. Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE. Enfermedades infecciosas: Principios y práctica. Elsevier. (2006). 6, 1756-1765.

6. Habif TP, Chapman MS, Campbell JL, Dinulos JGH, Zug KA. Enfermedades de la piel: Diagnóstico y Tratamiento. Elsevier España. (2006). 2, 198-190.
7. García-Rodríguez JA, Picazo JJ. Compendio de microbiología médica. Elsevier España. (1999). 1, 294-296.
8. Fica AC, Pérez CC, Reyes OP, Gallardo PS, Calvo PX. Encefalitis herpética. Serie clínica de 15 casos confirmados por reacción de polimerasa en cadena. Rev. Chil. Infect. (2005) 22, (1), 38-46.
9. Evans AS, Kaslow RA. Viral infections of humans: epidemiology and control. Springer. (1997). 4, 430.
10. Yanagihara N, Murakami S, New Horizons in Facial Nerve Research and Facial. Kugler New York. (1998). 1, 187.
11. Looker KJ, Garnett GP, Schmid GP. An estimate of the global prevalence and incidence of herpes simplex virus type 2 infection. Bulletin of the World Health Organization. (2008). 86, (10), 737-816

12. Alary M, Brown D, Corey L, Aral S, Buvé A, Cowan F, Shacker T, Van Dam J, Stanberry L, Mabey D, Meehan M, Kamali A. Herpes Simplex Virus Type 2: Programmatic And Research Priorities In Developing Countries. Report of a WHO/UNAIDS/LSHTM Wokrshop. (2001). 5, 1-6.
13. McQuillan G, Kruszon-Moran D. HIV Infection in the United States Household Population Aged 18-49 Years: Results from 1999-2006. (2008). 4, 1-8.
14. Conde-González CJ, Ponce EL, Hernández-Girón C, Juárez-Figueroa L, Hernández-Girón C, Juárez-Figueroa L, Smith JS, Hernández-Ávila. Seroprevalencia de la infección por el virus herpes simplex tipo 2 en tres grupos poblacionales de la Ciudad de México. Salud pública de México. (2003). 45, (5), 608-616.
15. Darby G. The Acyclovir Legacy: Its Contribution to Antiviral Drug Discovery. J. of Med. Virology Supplement. (1993).1, 134-138.

16. Bacon TH, Levin MJ, Leary JJ, Sarisky RT, Sutton D. Herpes Simplex Virus Resistance to Acyclovir and Penciclovir after Two Decades of Antiviral Therapy. *Clinical Microbiology Reviews*. (2003). 16, 114-128.
17. Elion GB. Acyclovir: Discovery, Mechanism of Action, and Selectivity. *J. of Med. Virology Supplement*. (1993). 1, 2-6.
18. Tursz T, Pagano JS, Ablashi DV, Leinoir GG. The Epstein Barr Virus and Associated diseases. *J. Libbey Eurotext*. (1993). 1, 602.
19. Scholar EM, Pratt BW. The antimicrobial Drugs. Oxford University Press. (2000). 1, 510.
20. Gennaro AR, Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Easton, P.A. (1995). 19, (2), 1332–1333.
21. Thomas J. Australian Prescription Products Guide. Australian Pharmaceutical Publishing. (1998). 1, 239-241, 261-263, 3035-3044.

22. Velázquez L. Lorenzo P. Moreno A. Lizasoain I. Leza JC. Moro M.A. Portoles A. Dermatología Básica y Clínica. Medica Panamericana. (2009). 18, 920.
23. Reardon JE. Spector T. Herpes Simplex Virus Type 1 DNA Polymerase. The Journal of Biological Chemistry. (1989). 284, (13), 7406–7411
24. Sitohy M. Billaudel S. Haertle T. Chobert JM. Antiviral Activity Esterified r-Lactalbumin and Lactoglobulin against Herpes Simplex Virus Type 1. Comparison the effect of acyclovir and L- Polylysines. J. Agric. Food Chem. (2007). 55, 10214–10220.
25. Page CP. Curtis MJ. Sutter MC. Walker MJA. Hoffman BB. Farmacología Integrada. Elsevier España. (1998). 1, 448.
26. Flóres J. Armijo JA. Farmacología humana. Elsevier. (2004). 4, 1218 – 1222.
27. Schnute ME, Cudahy MM, Brideau RJ, Homa FL, Hopkins TA, Knechtel ML, Oien NL, Pitts TW, Poorman RA, Wathen MW, WieberJL. 4-Oxo-4,7-dihydrothieno[2,3-*b*]pyridines as Non-Nucleoside Inhibitors of Human

Cytomegalovirus and Related Herpesvirus Polymerases *J. Med. Chem.* (2005). 48, 5794-5804.

28. Ortiz Montellano BR. Medicina, Salud y Nutrición Aztecas. Siglo XXI. México. (2003). 1, 30-36.

29. Jie G, Lin Z, Zhang L, Lv H, He P, Zhao B. Free Radical Scavenging Effect of Pu-erh Tea Extracts and Their Protective Effect on Oxidative Damage in Human Fibroblast Cells. *J. Agric. Food Chem.* (2006). 54, 8058-8064.

30. Ratnayake R, Covell D, Ransom TT, Gustafson KR, Beutler JA. Englerin A, a Selective Inhibitor of Renal Cancer Cell Growth, from *Phyllanthus engleri*. *Organic Letters*. (2009). 11, (1), 57–60.

31. Nostro A, Cellini L, Bartolomeo S, Campli E, Grande R, Cannatelli MA, Marzio L, Alonzo V. Antibacterial effect of plant extracts against *Helicobacter pylori*. *Phytotherapy Research*. (2005). 19, 198-202.

32. Altuner EM, Ceter T, Islek C. Investigation of antifungal activity of *ononis spinosa* l. ash used for the therapy of skin infections as folk remedies, Mikrobiyoloji Bulteni. (2010). 44, 633-639.
33. Niedermeyer TJH, Lindequist U, Mentel R, Gördes D, Schmidt E, Thurow K, Lalk M. Antiviral Terpenoid Constituents of *Ganoderma pfeifferi*. J. Nat. Prod. (2005). 68, 1728-1731.
34. Heinrich M. Ethnopharmacy and natural product research—Multidisciplinary opportunities for research in the metabolomic age. Phytochem Lett. (2003). 1, 1-5.
35. Hanson JR. Natural products: the secondary metabolites. Royal Society of Chemistry Cambridge. (2003). 1, 1-2.
36. Tan BKH, Bay BH, Zhu YZ. Novel compounds from natural products in the new millennium: potential and challenges. Nat. Prod. Rep. (2005). 22, (3), 1.
37. Larsson J, Gottfries J, Muresan S, Backlund A. ChemGPS-NP: Tuned for Navigation in Biologically Relevant Chemical Space. J. Nat. Prod. (2007). 70, 789-794.

38. Peddibhotla S, Dang Y, Liu JO, Romo D. Simultaneous Arming and Structure/Activity Studies of Natural Products Employing O-H Insertions: An Expedient and Versatile Strategy for Natural Products-Based Chemical Genetics. *J. Am. Chem. Soc.* (2007). 129, (40), 12222-12231.
39. Jung JC, Jang S, Lee Y, Min D, Lim E, Jung H, Oh M, Oh S, Jung M. Efficient Synthesis and Neuroprotective Effect of Substituted 1,3-Diphenyl-2-propen-1-ones. *J. Med. Chem.* (2008). 51, 4054–4058.
40. Rollinger JM, Haupt S, Stuppner H, Langer T. Combining Ethnopharmacology and Virtual Screening for Lead Structure Discovery: COX-Inhibitors as Application Example. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* (2004). 44, 480-488.
41. Zotchev SB, Stepanchikova AV, Sergeyko AP, Sobolev NB, Filimonov DA, Poroikov VV. Rational Design of Macrolides by Virtual Screening of Combinatorial Libraries Generated through in Silico Manipulation of Polyketide Synthases. *J. Med. Chem.* (2006). 49, 2077-2087.

42. Amoros M, Simoes CMO, Girre L. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *J Nat Prod.* (1992). 55, 1732-40.
43. Meyer JJM, Afolayan AJ, Taylor MB, Engelbrecht L. Inhibition of herpes simplex type 1 by aqueous extracts from shoots of *Helichrysum aureonitens* (Asteraceae). *J of Ethnopharm.* (1996). 52: 41-3.
44. Nolkemper S. Antiviral Effect Aqueous Extracts from Species of the Lamniaceae Family Against Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2 *in vitro*. *Planta Med.* (2006). 72, 1378–1382.
45. Likhitwitayawuid K, Supudompol B, Sritularak B, Lipipun V, Rapp K, Schinazi RF. Phenolics with Anti-HSV and Anti-HIV Activities from *Artocarpus gomezianus*, *Mallotus pallidus*, and *Triphasia trifolia*. *Pharmaceutical Biology.* (2005). 43, 651–657.
46. Martinez A, Guerra GMJ, Bedoya del Olmo JA, Bermejo Benito LM. Antiviral activity of medicinal plants. *Current Topics in Phytochemistry.* (2004). 6, 113-123.

47. Auvin C, Baraguey C, Blond A, Lezenven F, Pousset JL, Bodo B, Curcacycline B, a cyclic nonapeptide *from Jatropha curcas* enhancing rotamase activity of cyclophilin. Tetrahedron Letters. (1997). 38, (16), 2845-2848.
48. Krishnaswamy NR. Chemistry of Natural Products: A Laboratory Handbook. CRC Press Description. (2003). 2, 4–25.
49. Silva Mares DM. Fraccionamiento Biodirigido de *Ceanothus coeruleus* para la Obtención de Compuestos con Actividad Antimicrobiana Tesis de Maestría. (2007). 5-7.
50. Devappa RK, Makkar HPS, Becker K. *Jatropha* diterpenes: a Review. J Am Oil Chem Rev. (2011). 88, 301-322.
51. Silva S, Rivas C, Oranday C, Verde M, Cruz D, Rosales P. Determinación de la actividad antimicrobiana y citotóxica de la fracciones obtenidas de extracto hexánico de la raíz de *Jatropha dioica*. Revista de Salud Pública y Nutrición. (2004). 3, 02.

52. Hoogesteger C. Uso de plantas medicinales. Pax México D.F. (1988). 5, 145-148.
53. Martínez M, Matuda E. Flora del Estado de México. Biblioteca enciclopédica del Estado de México. Estado de México. (1979). 2, 42.
54. Márquez E. Aprovechamiento de La Sangre de Grado. Boletín de Experiencias Relevantes en la Prestación de Servicios para el Desarrollo Rural. CECADER Sagarpa.gob. (2007). No. 36.
55. Del Barrio G, Parra F. Evaluation of the antiviral activity of an aqueous extract from *Phyllanthus orbicularis*. Journal of ethnopharmacology. (2000). 72, (1-2), 317-322.
56. Xi-Ping Z, Man-Li Z, Xiao-Huo S, Chang-Hong H, Yu-Cheng G, Qing-Wen S. Chemical. Constituents of the Plants from Genus *Jatropha*. Chemistry & Biodiversity. (2009). 6, (12), 2166-2183.
57. Treviño L, Torres I, Cárdenas B, Vallarta M. Análisis de susceptibilidad de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos aislados de pacientes con

periodontitis, al extracto etanólico del tallo de *Jatropha dioica*. Revista Salud Pública y Nutrición. (2006). 4, 6.

58. Watson H, Zabel V. Rioloatrione. Acta Cryst B. (1982). 38, 689-691

59. Rakshit DK, Harinder MPS, Klaus B. *Jatropha* Toxicity: a Review. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews. (2010). 13, (6), 476-507.

60. Alanís BA; González GM; Salazar R; Waksman NH, Rivas VM. Screening of antifungal activity of plants from Northeast of Mexico. Journal of Ethnopharmacology. (2007). 114, 468-471.

61. Villarreal AM, Dominguez XA. Citlaltione, a New Diterpene from *Jatropha dioica* Var. Sessiliflora. Journal of Natural Products. (1988). 4, (51), 749-753.

62. Domínguez XA, Cano GA, Franco R, Villarreal AM, Watsona WH, Zabela V. Rioloatrione, a new class of diterpene from *Jatropha dioica* var. Sessiliflora. Phytochemistry. (1980). 11, (19), 2478.

63. Schnitzler P, Nolkemper S, Stintzing FC, Reichling J. Comparative in vitro study on the anti-herpetic effect of phytochemically characterized aqueous and ethanolic extracts of *Salvia officinalis* grown at two different locations. *Phytomedicine*. (2008). 15, (1-2), 62-70.
64. Tada M, Okuno K, Chiba K, Ohnishi E, Yoshii T. Antiviral diterpenes from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*. (1994). 2, (35), 539-541.
65. Poole JM, Carr WR, Price DM. Rare plants of Texas: a field guide. A&M University Texas Press. (2007). 1, 137.
66. Lehman RL, O'Brien R, White T. Plants of the Texas Coastal Bend. A&M University Press Texas. (2005). 1, 196.
67. Powell AM. Trees and shrubs of the Trans-Pecos and adjacent areas. University of Texas Press. (1998). 1, 348.

68. Villarreal QJA. Listados Florísticos de México: Flora de Coahuila. Instituto de Biología UNAM México D.F. (2001). 27, 103-104.
69. González A G, Castro ZEA, Gutiérrez LJ, GRA. New secoditerpenes from *Salvia texana* Transformations of 6,7-secoabietanes in basic medium and their possible formation via oxygen singlet participation. Journal of Chemical Research. (1989). 5, 132-133.
70. González A G, Aguilar Z E, Gutiérrez LJ, GRA, Domínguez X. Quinone methide diterpenoids from the roots of *Salvia texana*. Phytochemistry. (1988). 27 (6), 1777-1781.
71. Sukhramani PS, Desai SA, Suthar MP. In-vitro cytotoxicity evaluation of novel N-substituted bis-benzimidaz derivatives for anti-lung and anti-breast cancer activity. Annals of Biological Research. (2011). 2 (1), 51-59.
72. Mosmann T. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays," Journal of Immunological Methods. (1983). 65, (1-2), 55-63.

73. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*. (1986). 89, (2), 271-277.
74. Landry ML, Stant S, Biron K, Brambilla D, A Standardized Plaque Reduction Assay for Determination of Drug Susceptibilities of Cytomegalovirus Clinical Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother*. (2000). 44, (3), 688-692.
75. NCCLS. Antiviral Susceptibility Testing: Herpes Simplex Virus by Plaque Reduction Assay; Approved Standard. NCCLS document M33-A Pennsylvania. (2004). 19087-1898.
76. Karam AM, Shier T, A Simplified Plaque Reduction Assay for Antiviral Agents from Plants. Demonstration of Frequent Occurrence of Antiviral Activity in Higher Plants. *Journal of Natural Products*. (1990). 53, (2), 340-344.
77. Reed J, Muench H. A simple Method of Estimating Fifty per Cent Endpoint. *The American Journal of Hygiene*. (1938). 27, (3); 493-497.

78. Pérez-López A, Orozco-HayekM, Rivas-Galindo V, Waksman de Torres N.
Experimental design to determine the factors affecting the preparation of extracts
for antibacterial use. *Natural Product Communications*. (2008). 3, (3); 363-368.

APÉNDICE

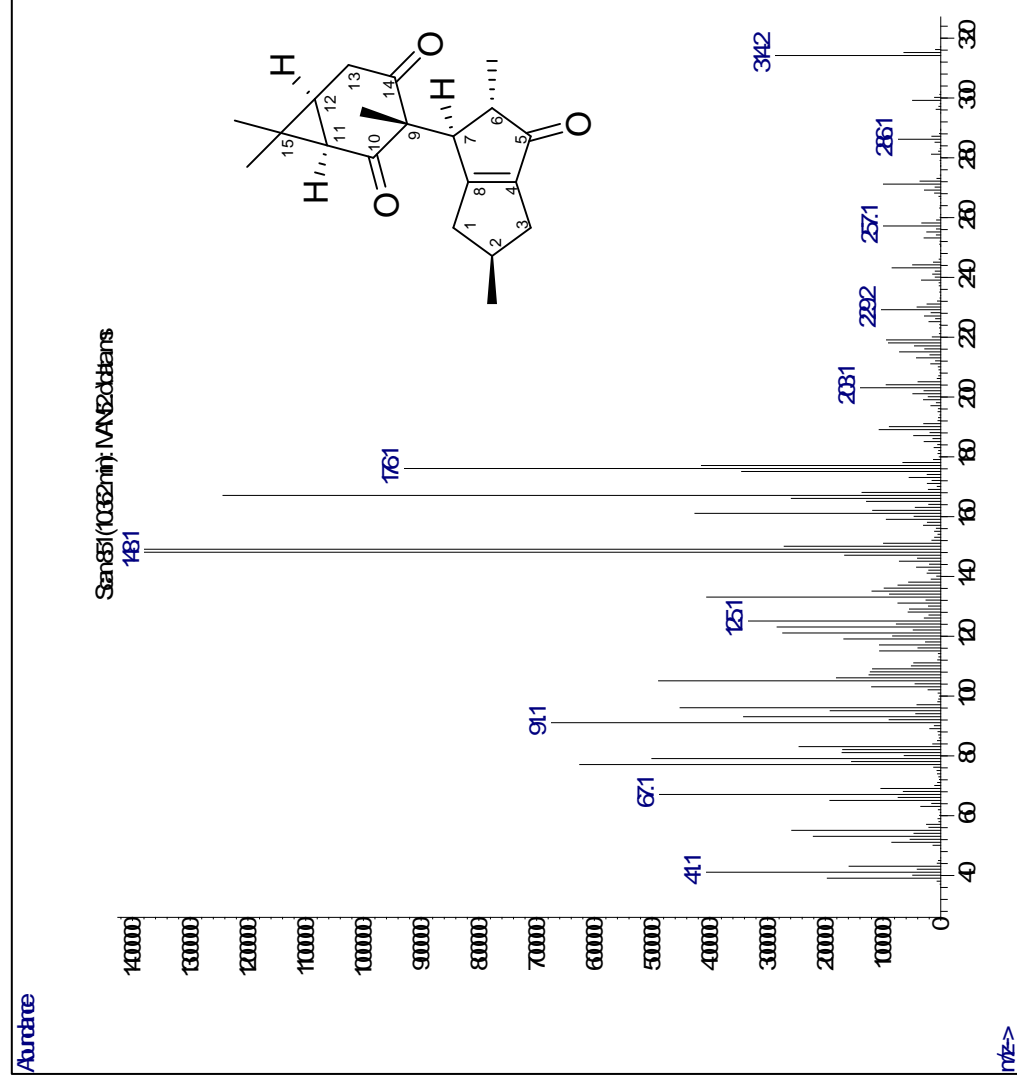


Figura 15. Espectro de Masas del Compuesto Aislado CSG4-F2.

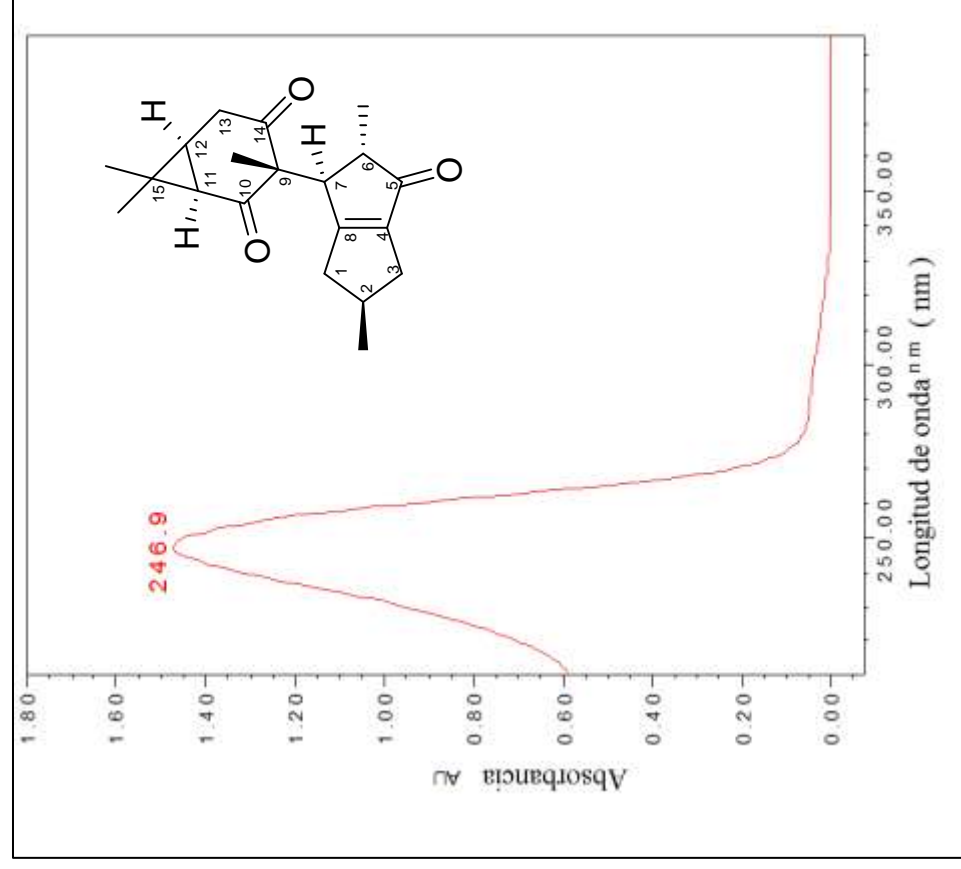


Figura 16. Espectro UV-Visible del Compuesto Aislado CSG4-F2

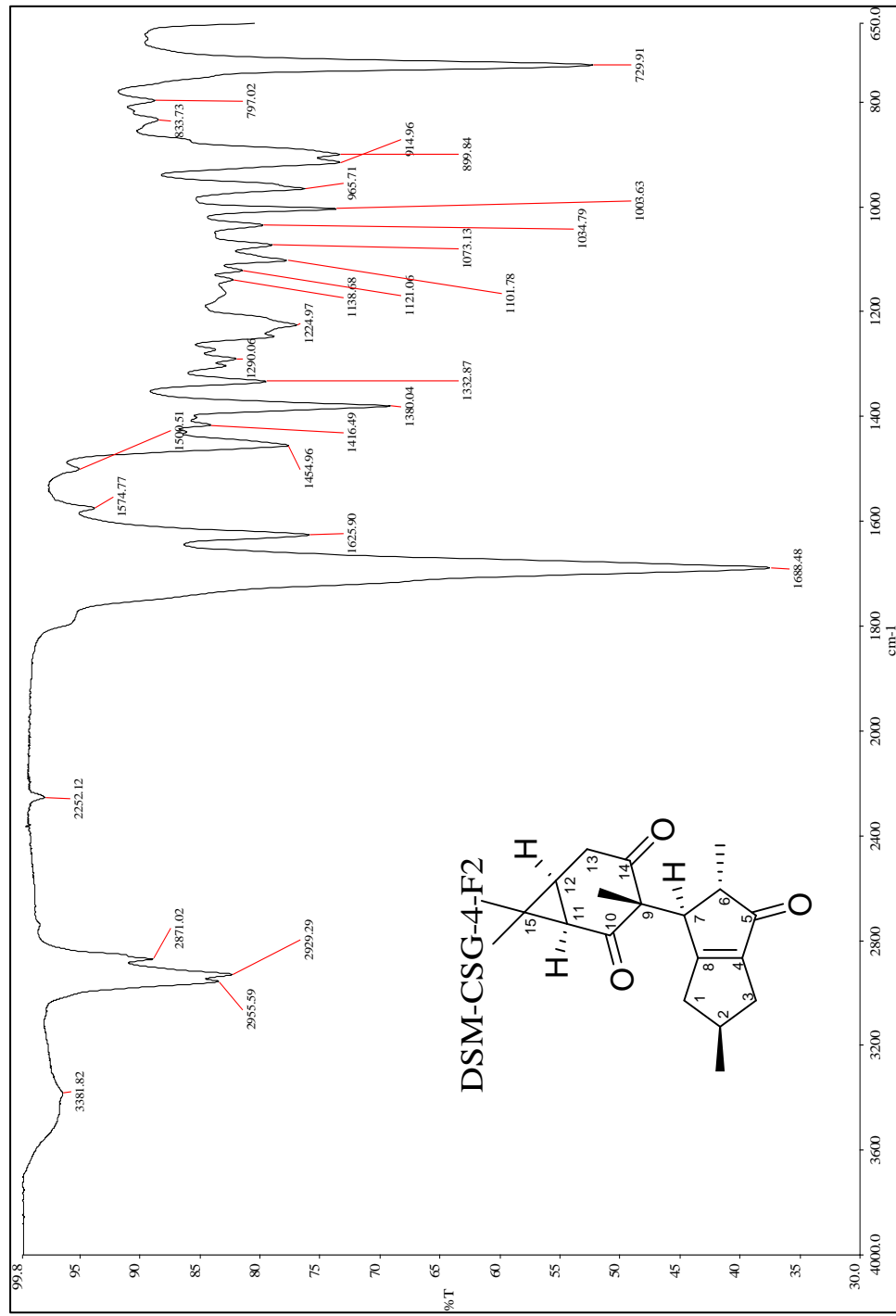


Figura 17. Espectro IR del Compuesto Aislado CSG4-F2.

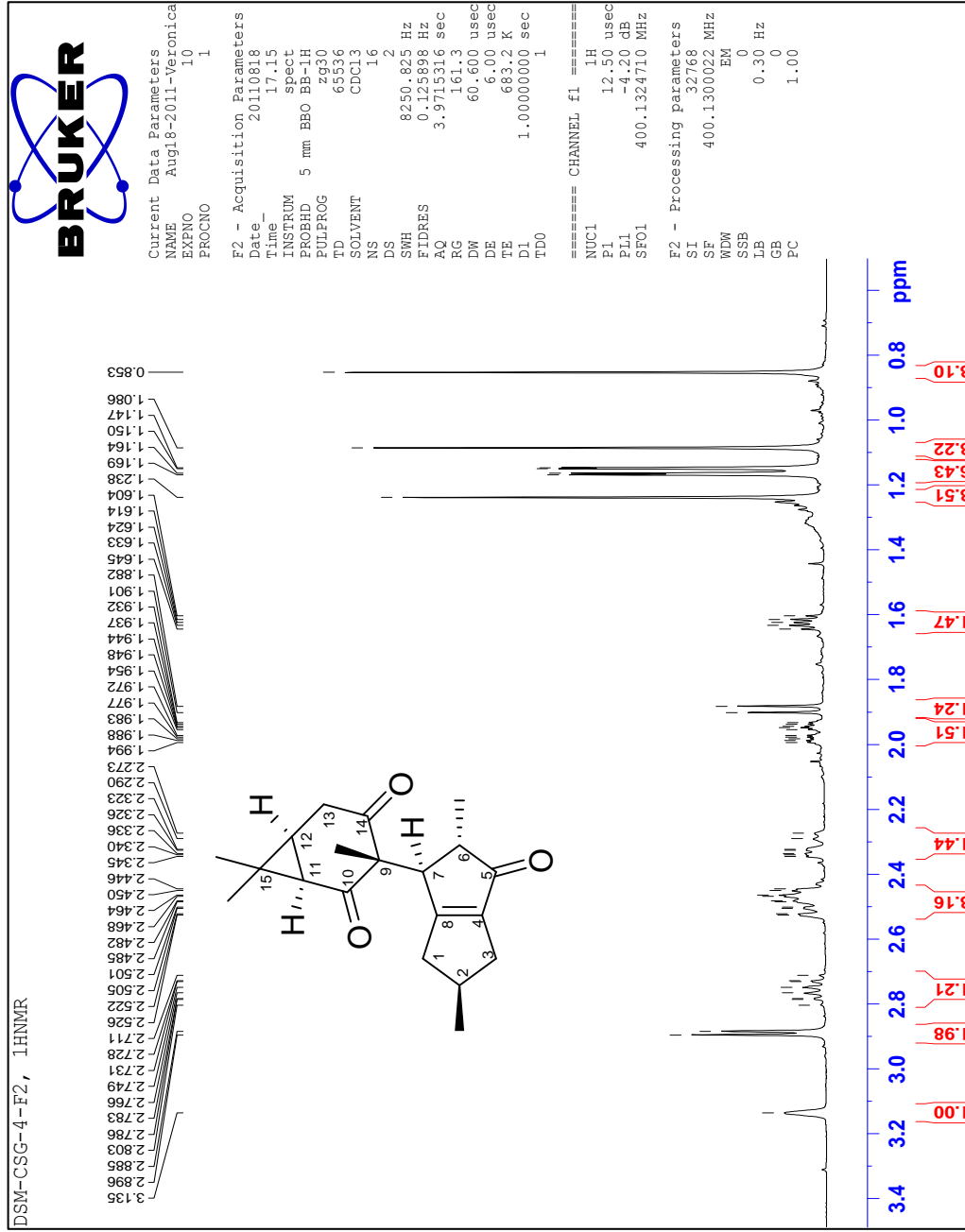


Figura 18. Espectro ¹H-RMN del Compuesto Aislado CSG4-F2.

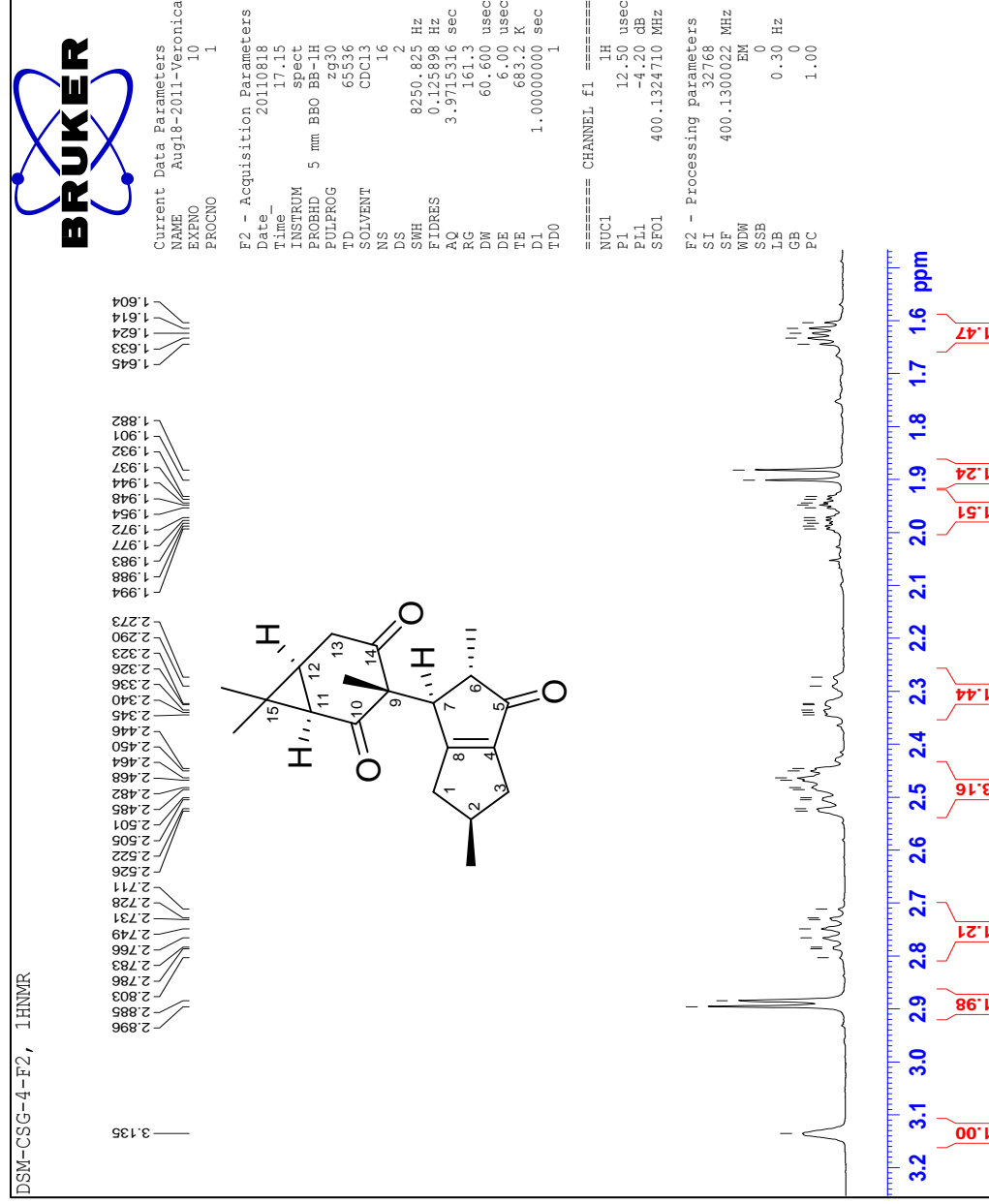


Figura 19 Ampliación de la Zona de Multipletes del Espectro ¹H-RMN del Compuesto Aislado CSG4-F2

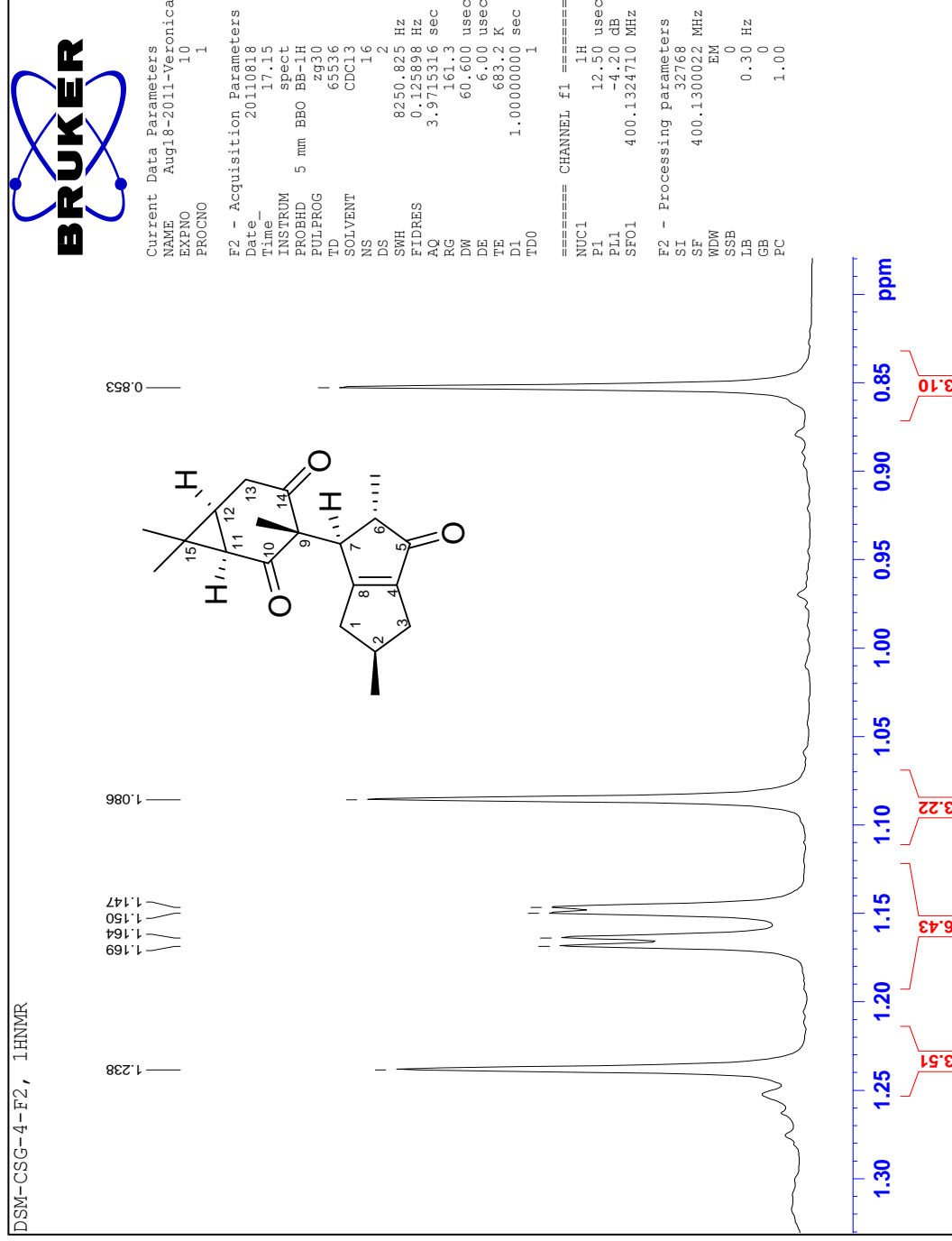


Figura 20. Ampliación de la zona de metilos del Espectro ^1H -RMN del Compuesto

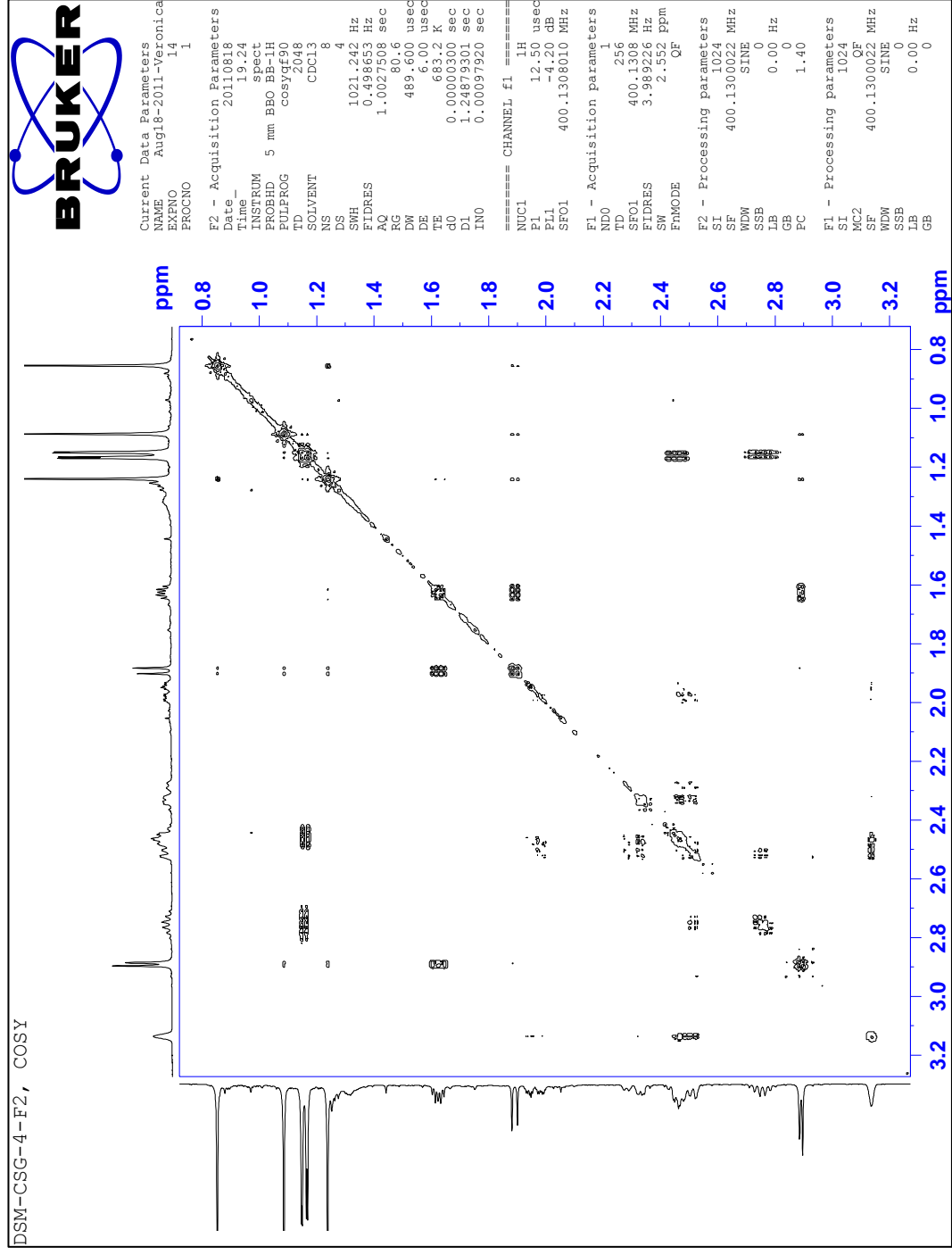


Figura 21. Espectro 2D COSY del Compuesto Aislado CSG4-F2.

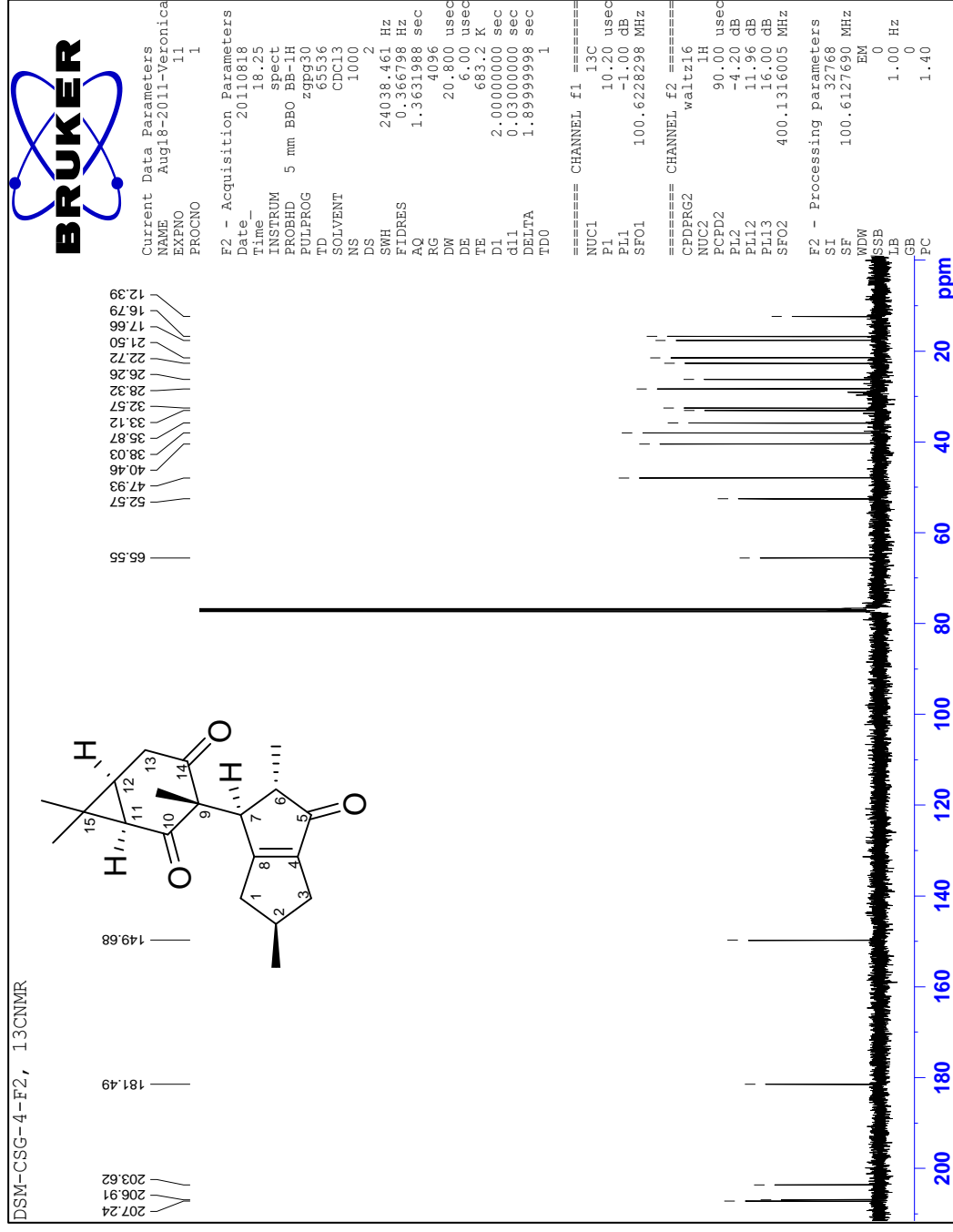


Figura 22. Espectro ^{13}C -RMN del Compuesto Aislado CSG4-F2.

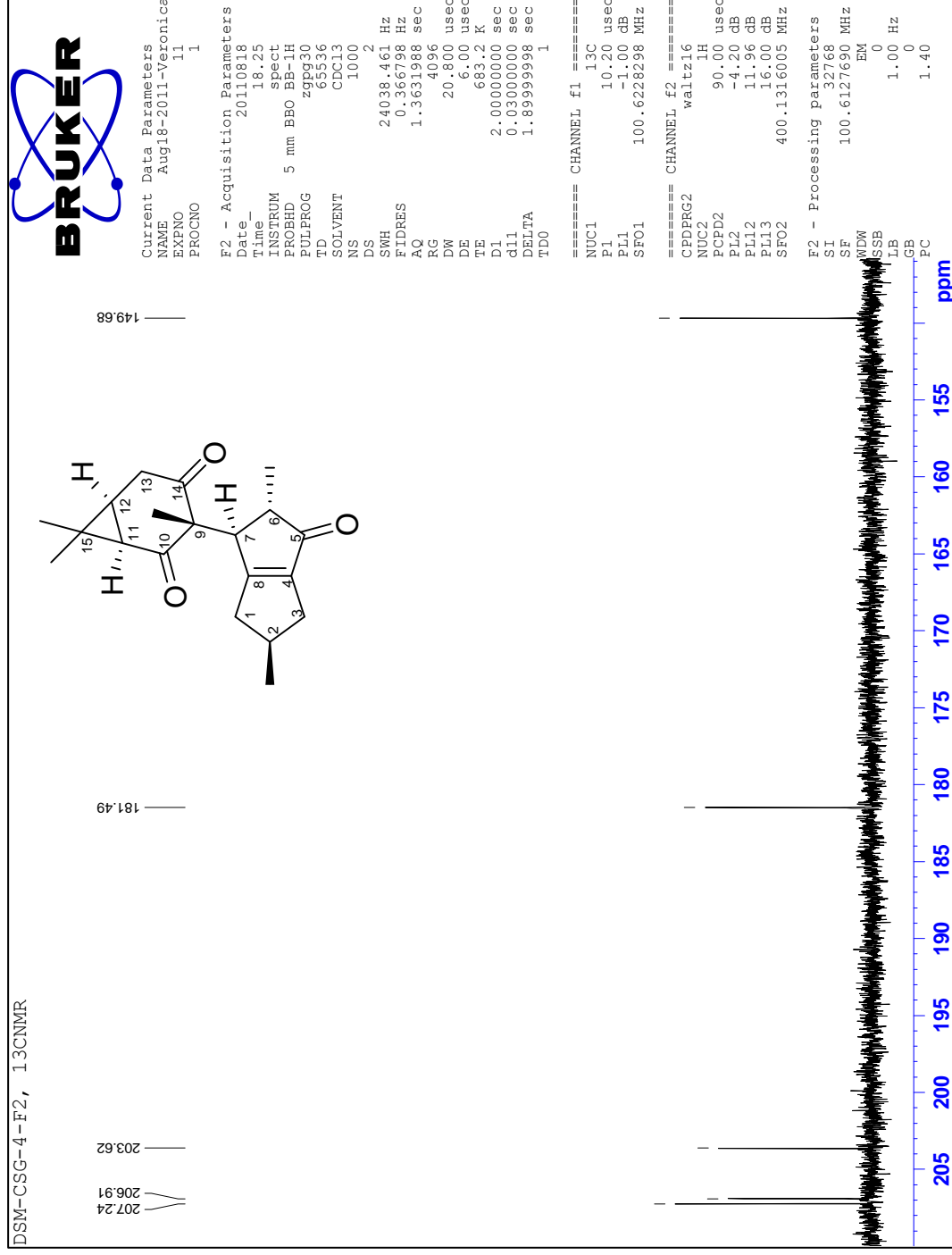


Figura 23. Ampliación de Zona de Aromáticos y Carbonilos de Espectro ^{13}C -RMN del Compuesto Aislado CSG4-F2.

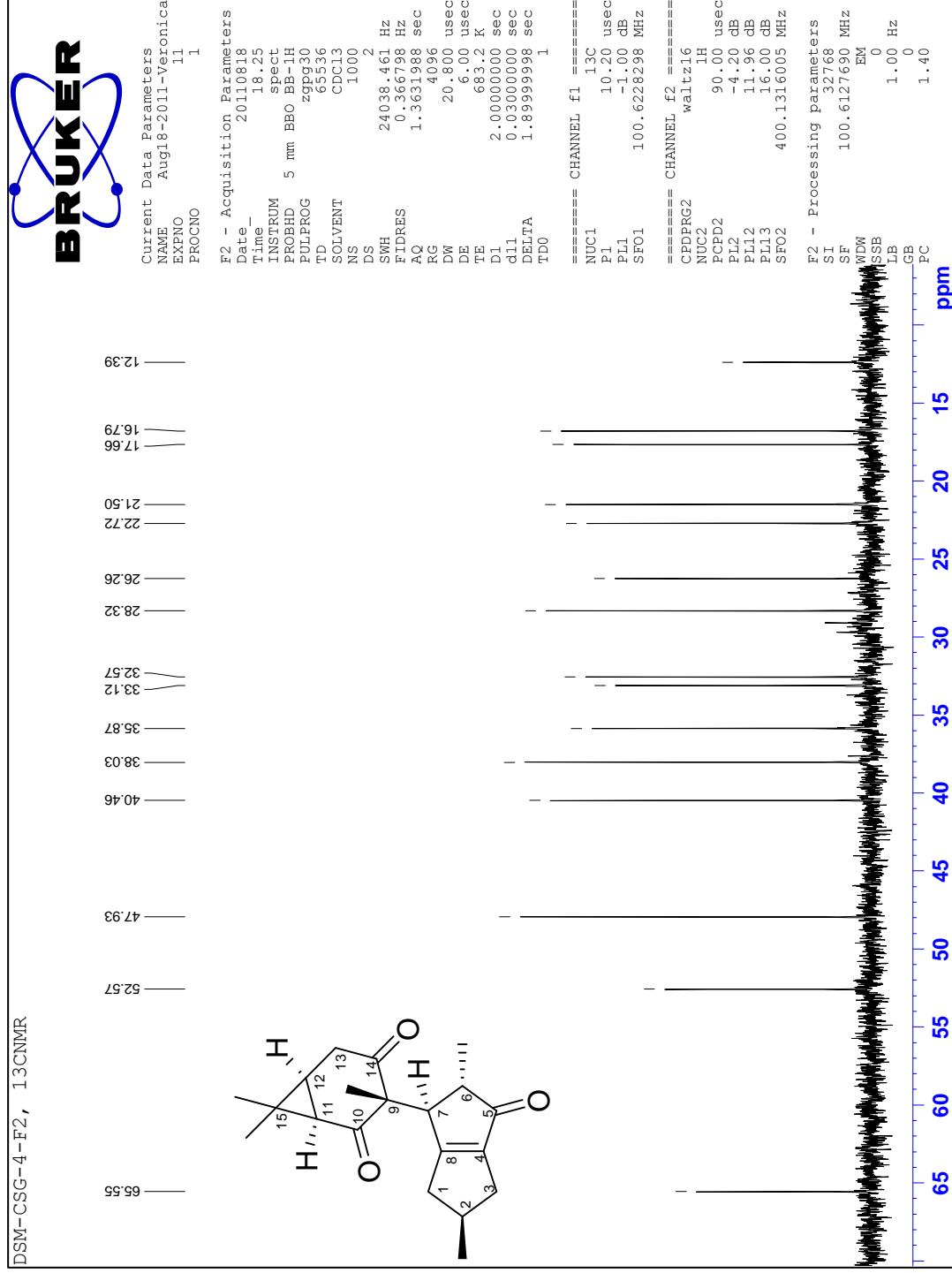


Figura 24. Ampliación de Zona de Alifáticos de Espectro ^{13}C -RMN del Compuesto Aislado CSG4-F2.

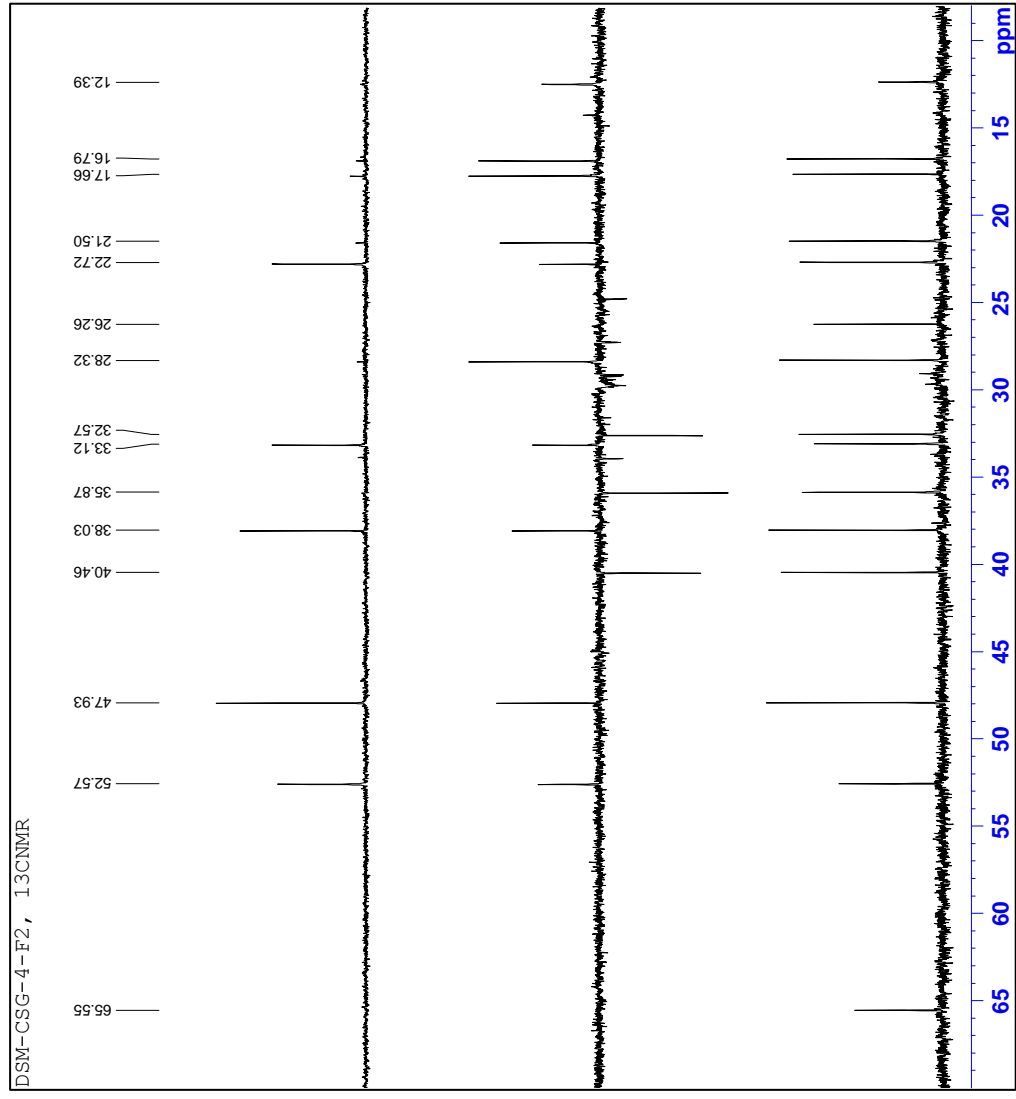


Figura 25. Espectro ^{13}C -RMN, DEPT90 y DEPT 135 del Compuesto Aislado CSG4-F2.

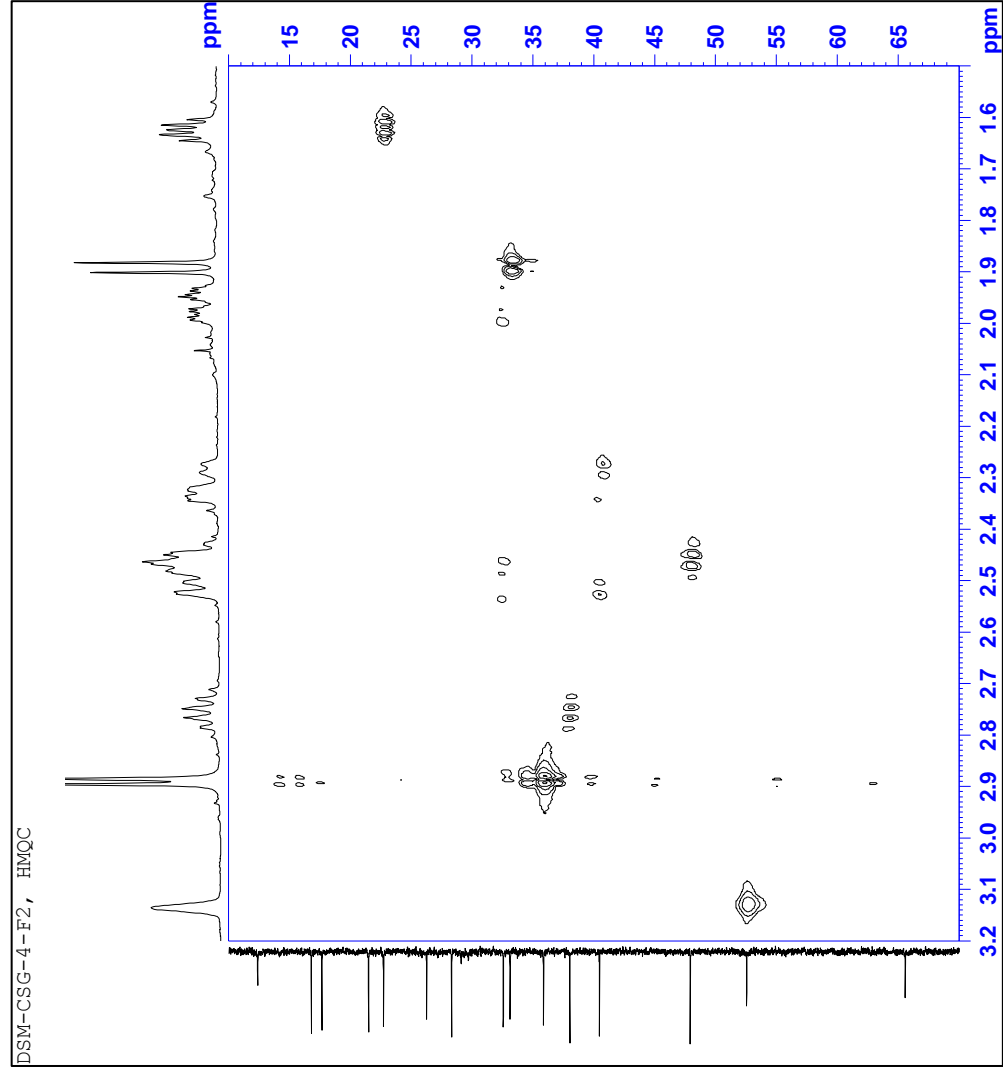


Figura 26. Ampliación del Espectro de 2D de HMQC del Compuesto Aislado CSG4-F2.

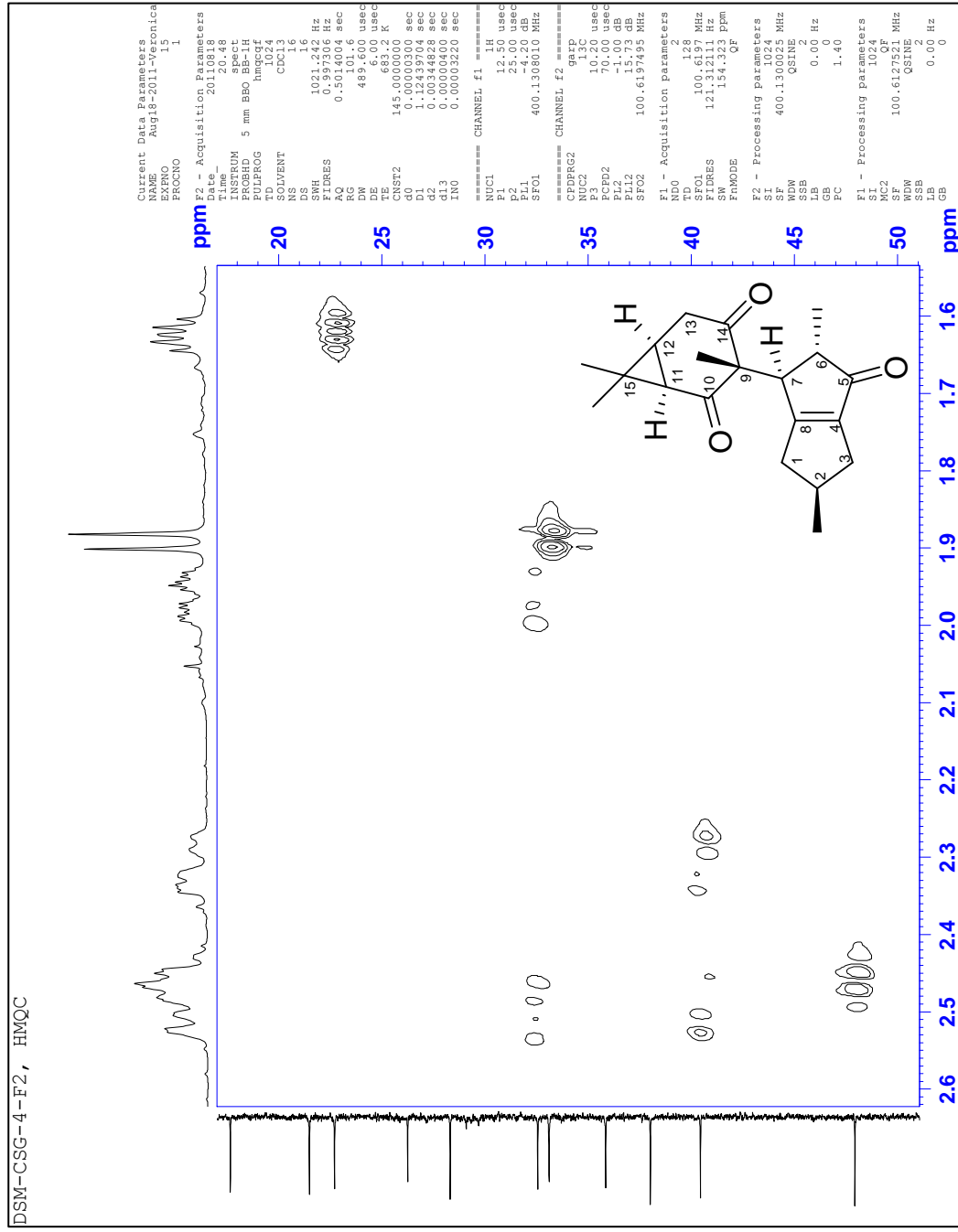


Figura 27. Espectro del Experimento de 2D de HMQC del Compuesto Aislado CSG4-F2.

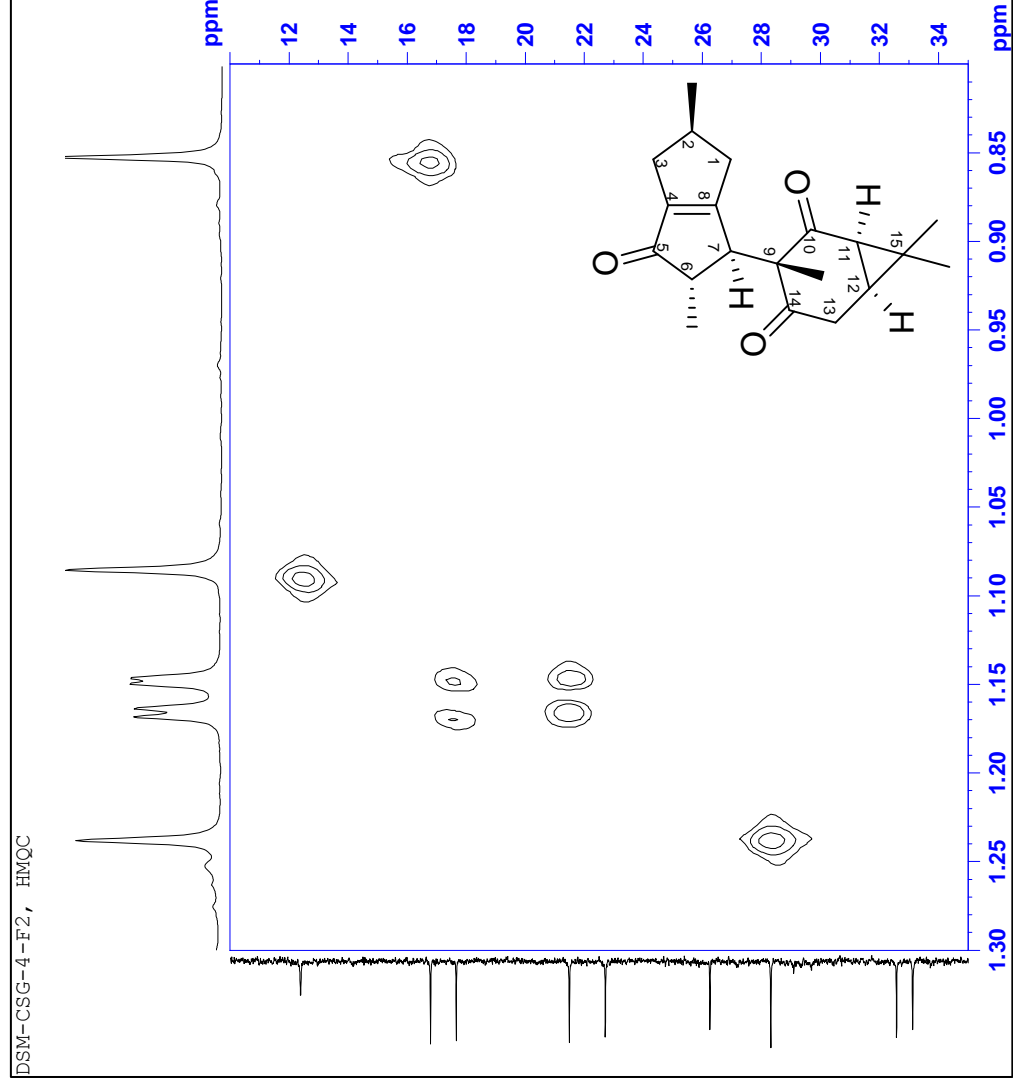


Figura 28. Ampliación del Espectro de 2D de HMQC del Compuesto Aislado CSG4-F2.

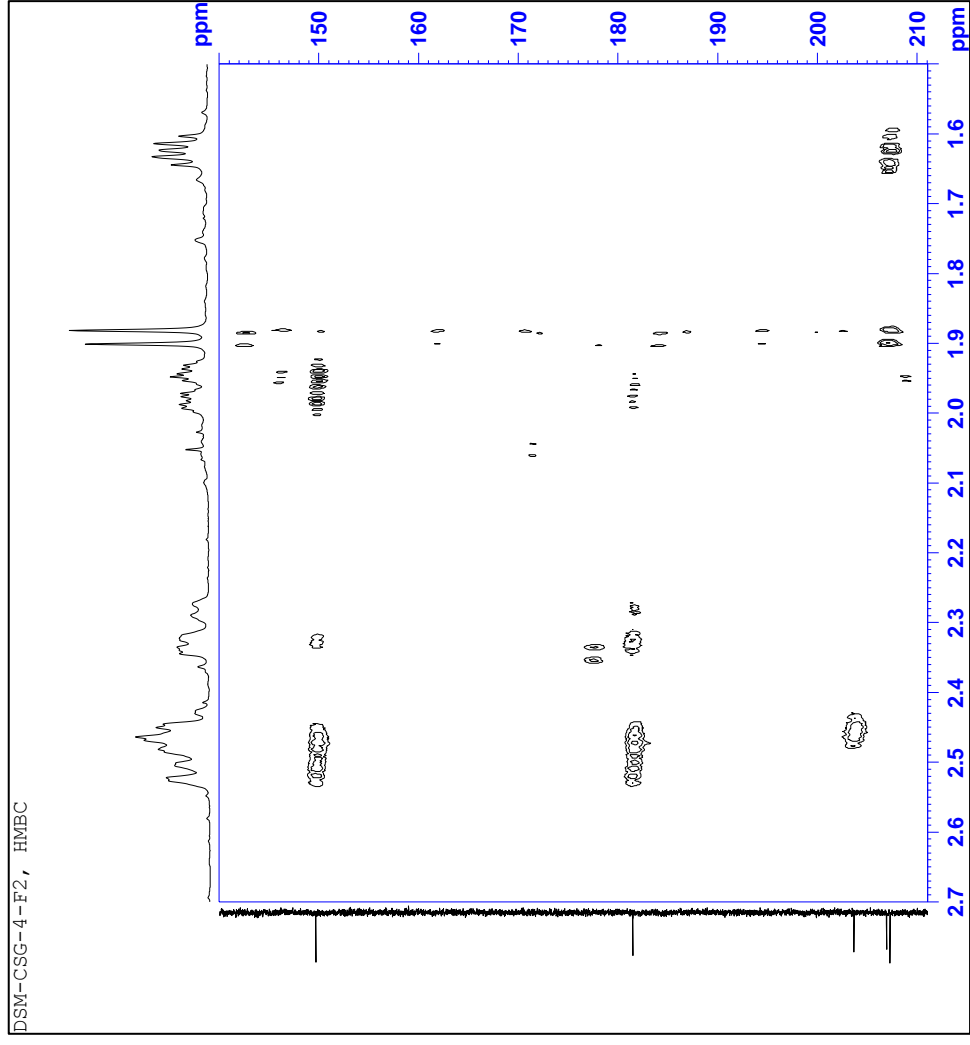
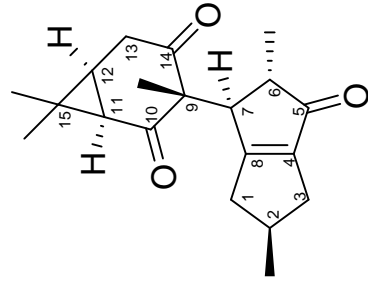


Figura 29. Espectro de 2D de HMBC del Compuesto Aislado CSG4-F2.

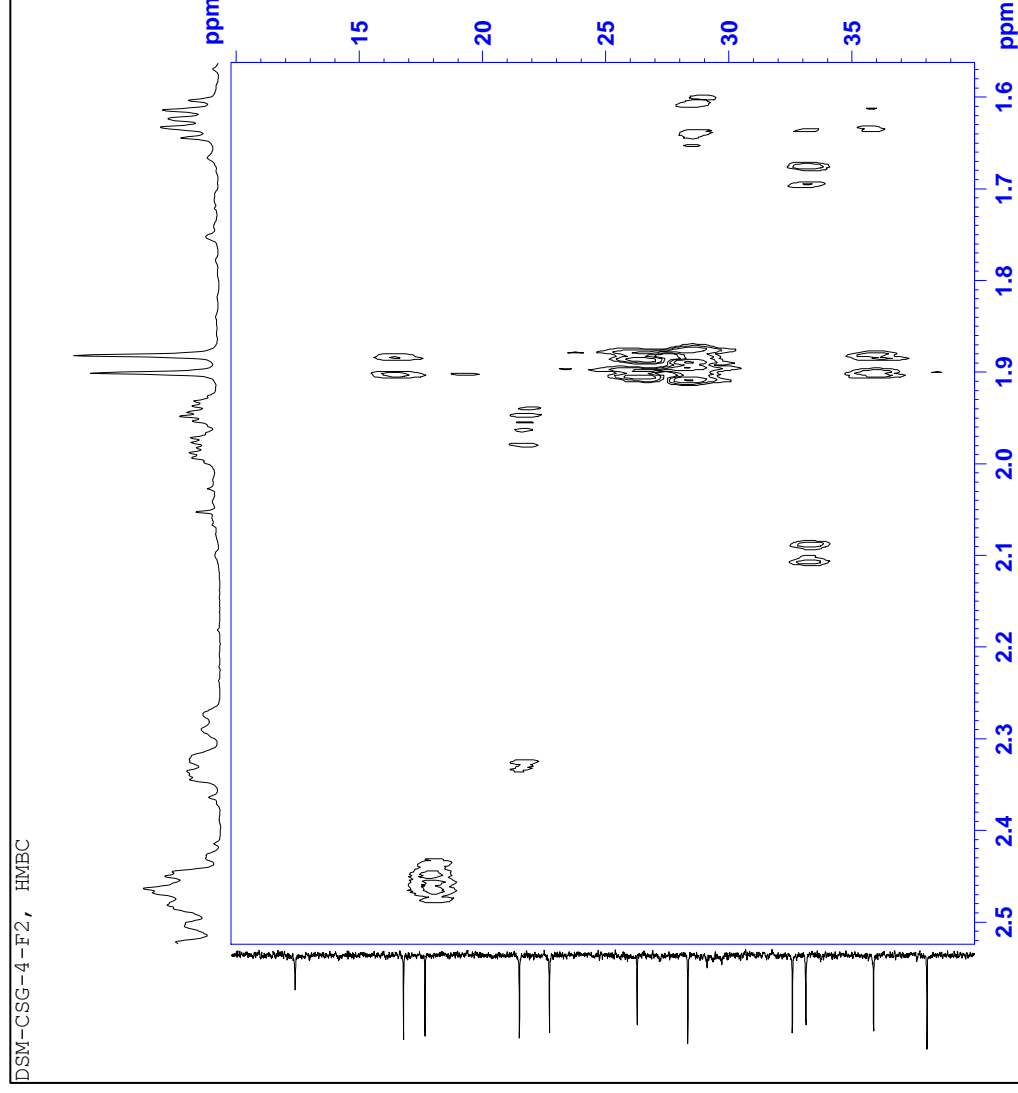
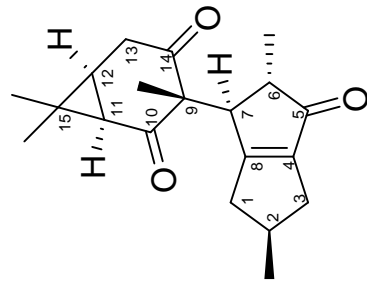


Figura 30. Ampliación de Espectro de 2D de HMBC del Compuesto Aislado CSG4-F2.

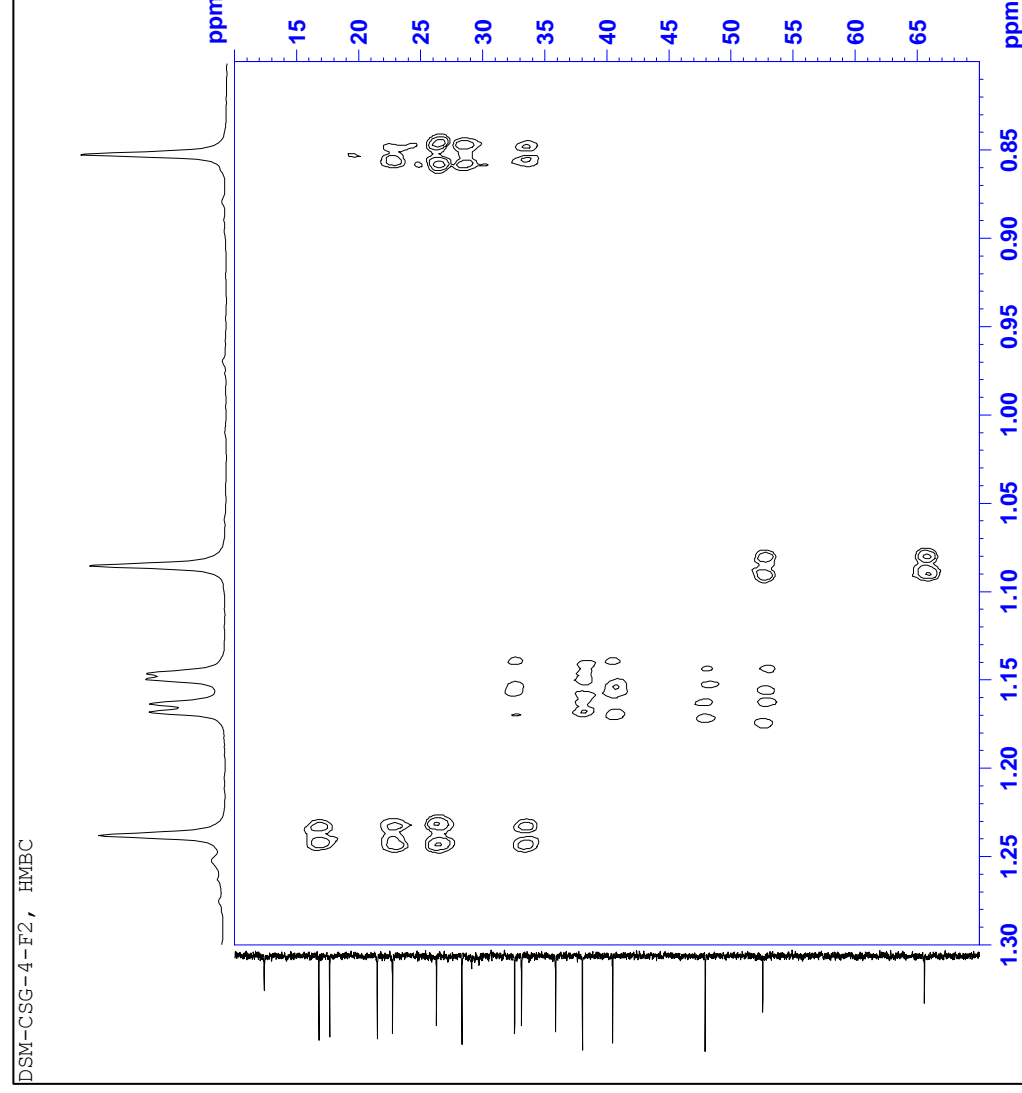
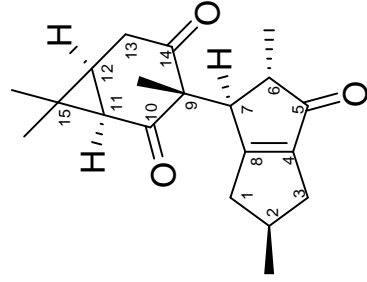


Figura 31. Ampliación de Espectro de 2D de HMBC del Compuesto Aislado CSG4-F2.

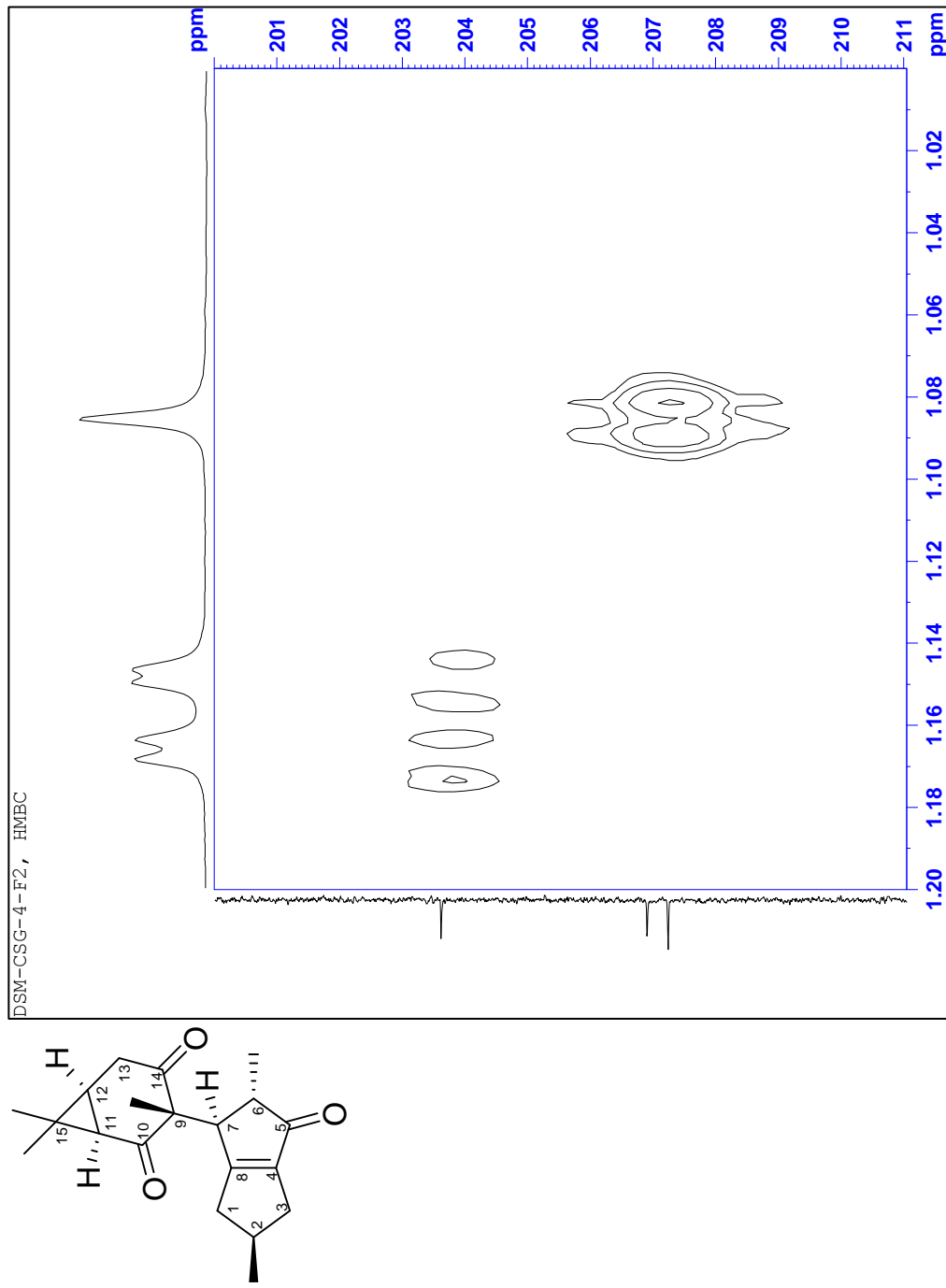


Figura 32. Ampliación de Espectro de 2D de HMBC del Compuesto Aislado CSG4-F2.

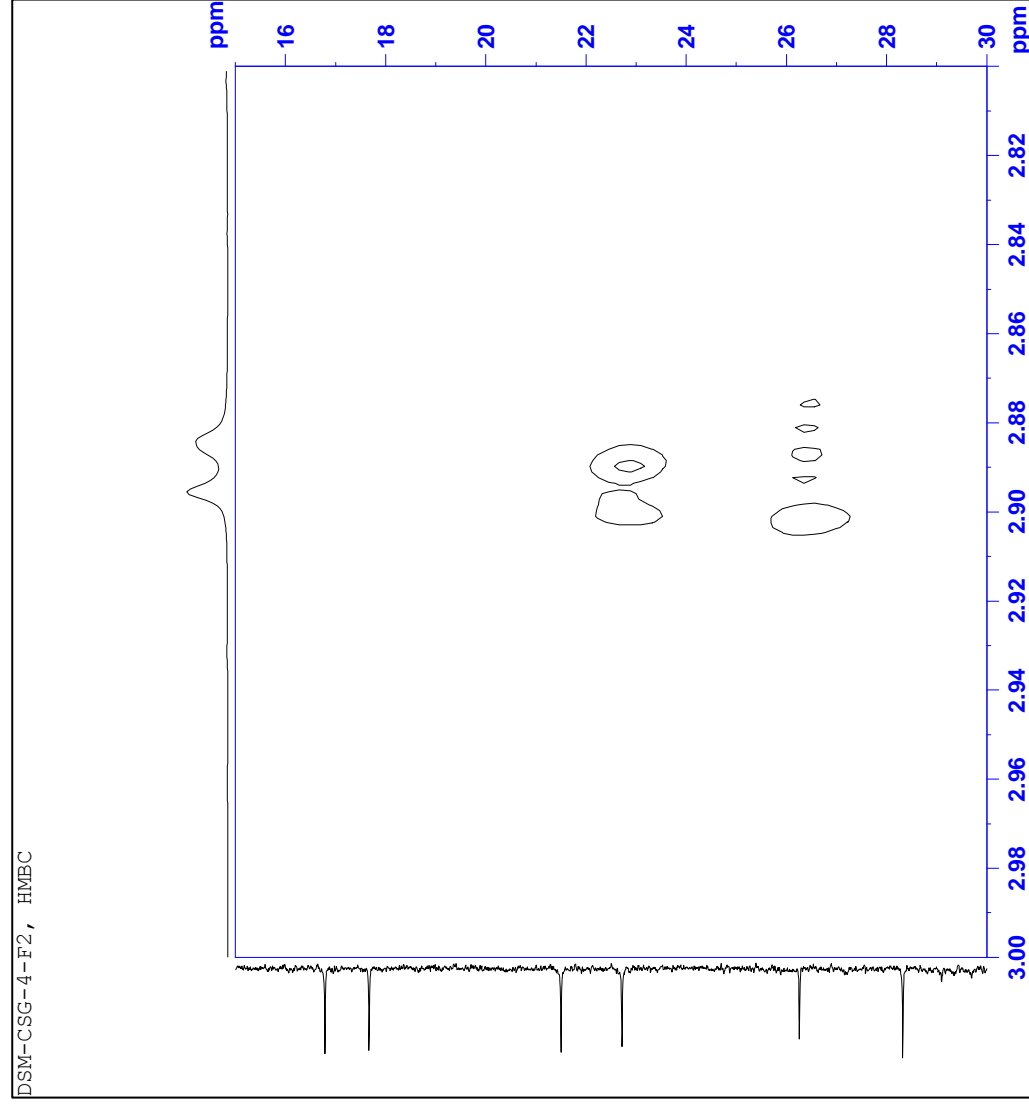
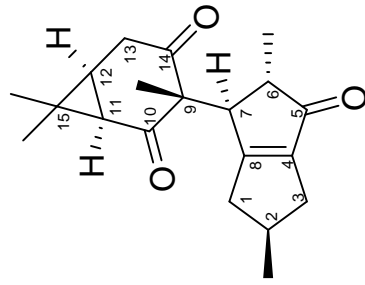


Figura 33. Ampliación de Espectro de 2D de HMBC del Compuesto Aislado CSG4-F2.

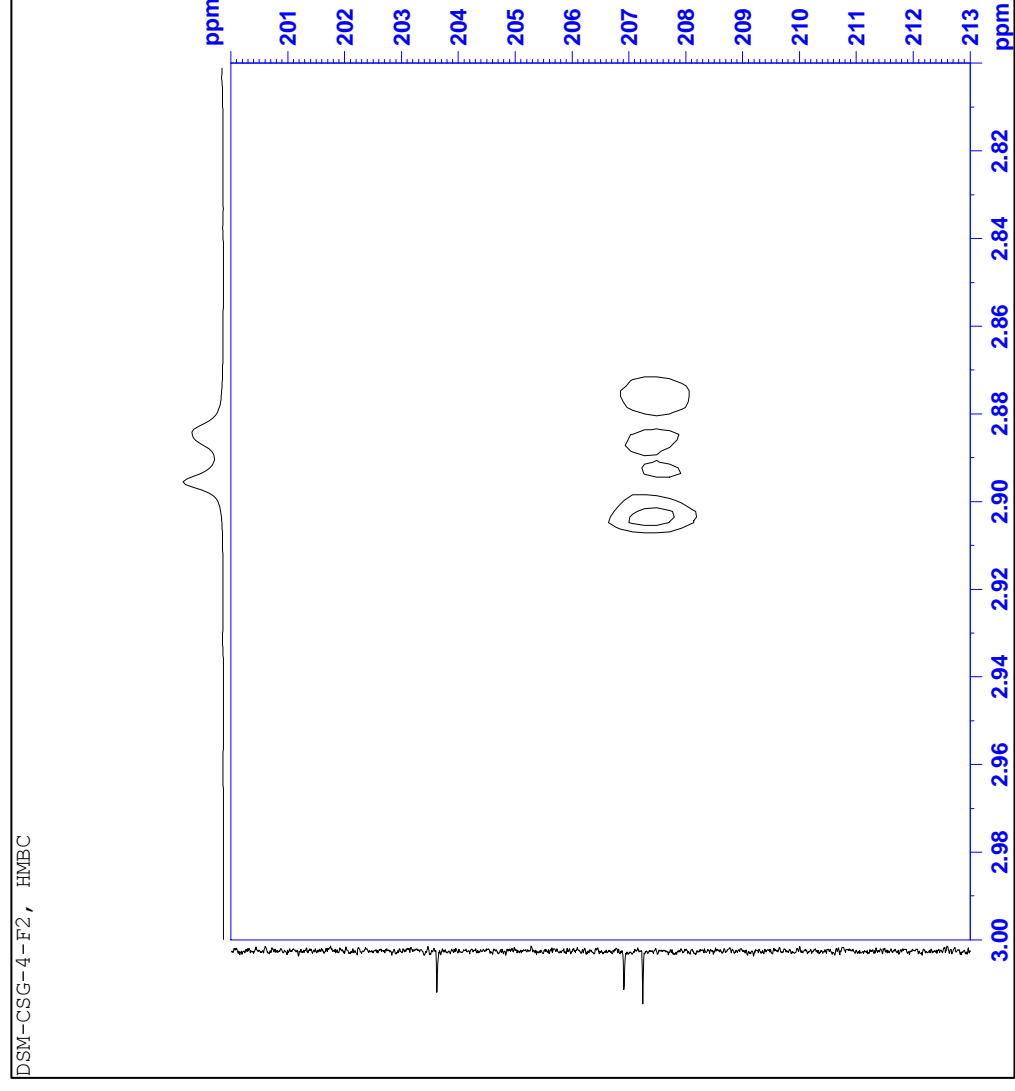
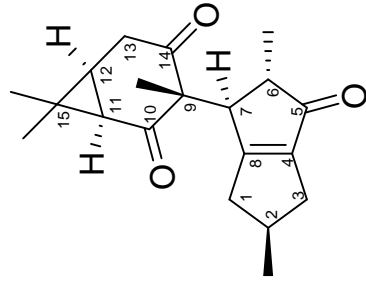


Figura 34. Ampliación de Espectro de 2D de HMBC del Compuesto Aislado CSG4-F2.

